

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	viii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 L'infertilité féminine.....	1
1.2 La reproduction chez la femme.....	2
1.3 Anatomie et histologie de l'utérus de la ratte.....	4
1.4 Cycle œstral de la ratte.....	6
1.5 Gestation et pseudogestation chez la ratte.....	7
1.5.1 Implantation embryonnaire.....	7
1.5.2 La décidualisation.....	9
1.5.3 La parturition.....	11
1.6 L'apoptose.....	11
1.6.1 Les caspases.....	11
1.6.2 Voie de signalisation.....	12
1.7 Le Transforming growth factor- β (TGF- β).....	14
1.7.1 Signalisation cellulaire par les TGF- β	14
1.7.2 Le TGF- β dans la gestation.....	15
1.8 La voie de signalisation PI3-K/Akt.....	15
1.8.1 Signalisation cellulaire de la voie.....	16
1.8.2 Akt dans la gestion.....	16
1.8.3 Régulation de l'apoptose par XIAP et Smac/DIABLO.....	18
1.8.4 Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN).....	19
1.8.5 I κ B et NF κ B.....	20
1.9 Hypothèse/Objectif.....	21

CHAPITRE II	
REGULATION OF THE PI3-K/AKT SURVIVAL PATHWAY IN THE RAT	
ENDOMETRIUM	23
2.1 Résumé de l'article	24
2.2 Article	25
Abstract.....	26
Introduction.....	26
Materials and methods	28
Reagents	28
Animals	28
Decidual cell culture	29
Protein extraction and Immunoblotting	30
Immunoprecipitation.....	30
Immunohistochemistry.....	31
Statistical analysis.....	31
Results.....	32
Expression of Akt-1, -2 and -3 in the pregnant and pseudopregnant	
rat endometrium	32
<i>In vivo</i> activation of Akt-1, -2 and -3 in endometrial cells	33
<i>In vivo</i> modulation of XIAP, Smac/DIABLO and PTEN in	
endometrium	33
pI κ B expression is dependent of the presence of conceptus.....	33
Effect of PI3-K inhibition on pAkt and XIAP expression	34
Discussion	34
Conclusion	40
References.....	41
Figures legends	46
CHAPITRE III	
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	55
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	64

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Régulation hormonale de la fonction de reproduction chez la femme.....	3
1.2	Système reproducteur de la ratte (photo du laboratoire du Dr Asselin). O = Ovaire; C = Corne utérine; C.U. = Corps utérin	5
1.3	Histologie de l'endomètre de ratte (photo du laboratoire du Dr Asselin). Photo prise au grossissement 40X.....	5
1.4	Cycle œstral de la ratte (photo du laboratoire du Dr Asselin). Photo prise au grossissement 10X.....	6
1.5	Orientation du blastocyste lors de l'implantation. M = mésomètre; AM = antimésométrial	8
1.6	Implantation embryonnaire dans la paroi utérine chez l'humain.....	8
1.7	Formation du déciduala entourant l'embryon. M = mésométrial; AM = antimésométrial; IS = Site d'implantation.....	10
1.8	Cascade d'activation des caspases	12
1.9	Voie extrinsèque et intrinsèque du phénomène d'apoptose dans une cellule	13
1.10	Voie de signalisation PI3K/Akt en parallèle avec la voie des TGF- β	16
1.11	Rôles d'Akt lorsqu'elle est activée	17
1.12	Mécanisme potentiel qui permettrait la fonction spécifique de chaque isoforme d'Akt.....	18
3.1	Schéma récapitulatif du mécanisme protéique impliqué entre l'embryon et l'endomètre lors de la gestation	61

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Akt	Activated by kinase tyrosine
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-x _L	BCL-2 like 1
Caspase	Cysteine-containing aspartate specific proteases
CDK	Cyclin-dependent kinase
COX-1; COX-2	Cyclooxygenase-1; -2
ER- α	Estrogen receptor α
ER- β	Estrogen receptor β
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
Fas	TNF superfamily receptor 6
Fas-L	Fas ligand
Fas-R	Fas receptor
FSH	Hormone folliculo-stimulante
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
I κ B	Inositol- κ B
Jnk	Jun N-terminal kinase
LAP	Latency associated peptide
LH	Hormone lutéinisante
MAPK	Mitogen activated protein kinase

mTORC2	Mammalian target of rapamycin complexe 2
NFκB	Nuclear Factor-κB
pAkt	phosphoAkt
PDK	Phosphoinositide-Dependent Kinase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinases
PIP2	Phosphatidylinositol 2-Phosphate
PKB	Protein kinase B
PIP3	Phosphatidylinositol 2-3-Phosphate
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome ten
ROCK	Rho-associated kinase
Smac/DIABLO	Second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP-binding protein with low pI
Smad	Contraction the Sma et Mad (mothers against decapentalegic)
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
Tβ-RI	TGF-β receptor I
Tβ-RII	TGF-β receptor II
TNF-α	Tumor necrosis factor α
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 L'infertilité féminine

Selon Statistique Canada, le taux d'infertilité a augmenté depuis les deux dernières décennies [3]. La fertilité est affectée par trois facteurs : l'efficacité de reproduction, le contrôle humain et les facteurs de régulation psychosociaux. L'efficacité de reproduction est la probabilité d'opérer un cycle menstruel normal, qui est en moyenne de 25 %. Le contrôle humain s'effectue, entre autres, par l'utilisation ou non de contraceptifs. Il entre également en jeu pour remédier à une hypofertilité ou encore pour obtenir une grossesse dans des délais raisonnables. Quant aux facteurs de régulation psychosociaux, ils peuvent être conscients ou inconscients. Les facteurs conscients comprennent, par exemple, les éléments culturels (monogamie ou polygamie) et le comportement sexuel. Les facteurs inconscients sont des facteurs qui interagissent avec le contrôle neuroendocrinien hypothalamo-hypophyso-gonadique [4]. Par exemple, le stress peut être un facteur inconscient menant à un dérèglement.

Il existe différentes causes d'infertilité chez la femme. Cela peut être dû à un déséquilibre hormonal, à l'obstruction des trompes de Fallope ou à de l'endométriose (formation de cellules endométriales à l'extérieur de l'utérus). L'infertilité peut aussi être reliée à des facteurs utérins ou des facteurs immunitaires.

Également, les diverses interactions entre l'utérus et le *conceptus* (latin du mot enfant) peuvent être des facteurs limitant une grossesse. En effet, un problème d'implantation du blastocyste au niveau de l'endomètre de l'utérus peut empêcher une grossesse chez la femme. Les deux tiers des échecs d'implantation sont dus à une réceptivité utérine inadéquate, alors que l'autre tiers est dû à l'embryon lui-même.

De leur côté, les naissances prématurées peuvent être néfastes pour le nouveau-né par le manque de maturité du cœur et des poumons. Enfin, l'avortement spontané chez l'humain (fausse couche) est l'expulsion du conceptus avant le terme de 28 semaines. Les causes de ce type d'avortement peuvent être maternelles ou embryonnaires. Dans les deux cas, ceci mène à la perte du *conceptus*.

1.2 La reproduction chez la femme

La reproduction humaine commence au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique. Cet axe est constitué de l'hypothalamus, de l'hypophyse et des gonades. L'hypothalamus libère de façon pulsative de la GnRH. Celle-ci est transportée le long des axones pour activer la sécrétion de LH et de FSH au niveau de l'hypophyse. Ces deux hormones sont libérées dans la circulation sanguine et se lient ensuite aux cellules gonadiques. Ces dernières produiront des hormones stéroïdiennes, telles que l'œstrogène, la progestérone et la testostérone. Ces hormones iront par la suite faire une rétroaction négative au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse [5]. Cette rétroaction permet de limiter la quantité d'hormone stéroïdienne présente dans le système. (Figure 1.1).

Régulation hormonale de la fonction de reproduction chez la femme

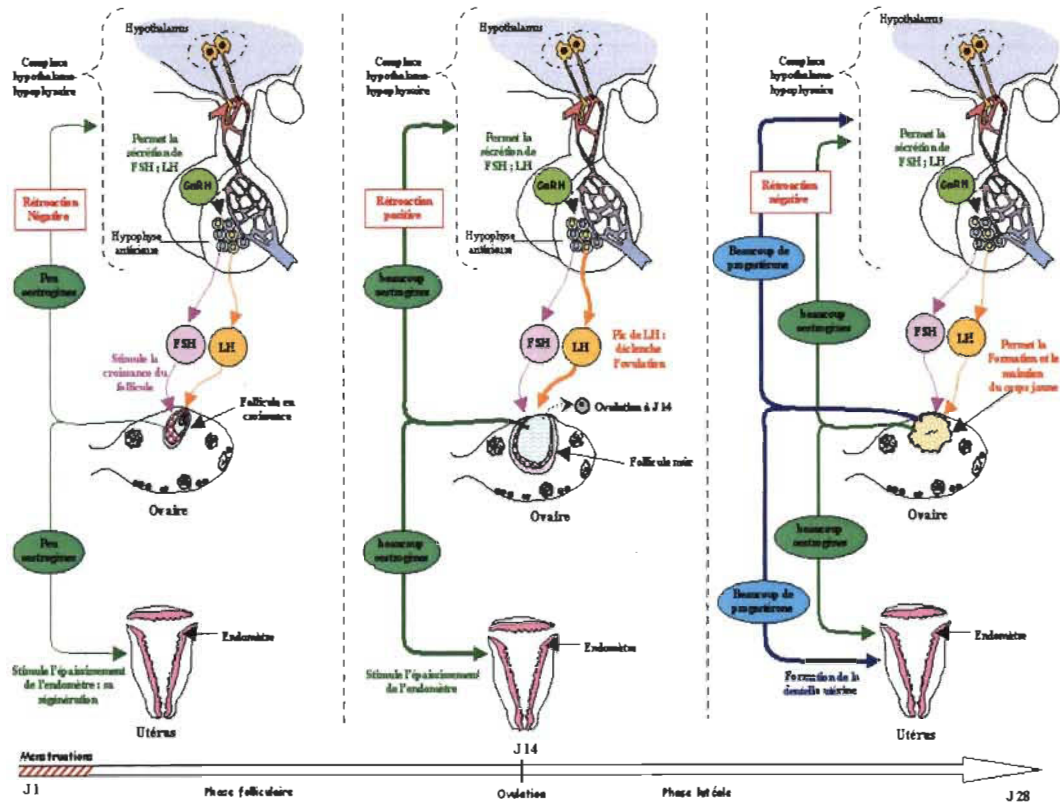


Figure 1.1 Régulation hormonale de la fonction de reproduction chez la femme [6].

Aussi présent dans le processus de la reproduction, le tractus génital féminin est composé des ovaires, des trompes de Fallope, de l'utérus, du col utérin et du vagin. L'utérus, sous l'influence de la sécrétion hormonale des ovaires, subit des modifications histologiques (Figure 1.1). Sous l'influence de l'œstrogène, dans la période préovulatoire du cycle menstruel, les cellules épithéliales et les glandes de l'endomètre prolifèrent grandement. La vascularisation du tissu est également modulée en lien avec cette prolifération. Suite à l'ovulation, la progestérone est l'hormone stéroïdienne dominante affectant l'endomètre. Les cellules stromales gonflent dû à un métabolisme accru. Sans implantation embryonnaire, le corps jaune de l'ovaire cesse la sécrétion de progestérone et l'endomètre subit alors une nécrose (mort cellulaire) qui a pour conséquence les menstruations. Par contre, s'il y a présence de blastocyste, le corps jaune poursuit la sécrétion de progestérone pour maintenir la décidualisation des cellules stromales et ainsi assurer la continuité de la grossesse [5].

Après l'entrée du blastocyste dans l'utérus, les cellules trophoblastiques (cellules qui sont destinées à former le placenta) envahissent une région de l'endomètre suite à l'attachement aux cellules épithéliales. Ceci est l'étape de l'implantation. La reconnaissance du blastocyste par les cellules endométriales est l'un des facteurs qui peut affecter le succès de la grossesse.

Suite à l'implantation, les cellules endométriales subissent divers changements biochimiques et morphologiques nommés décidualisation. Ce phénomène débute à l'endroit d'attachement du trophoblaste et se répand dans toute la zone d'implantation. La réception par l'endomètre des signaux de la présence de trophoblaste, afin de permettre la décidualisation, est un autre facteur qui peut affecter le succès de la grossesse. Enfin, l'endomètre se referme de façon à recouvrir complètement le conceptus. Celui-ci se retrouve en situation interstitielle [5].

La grossesse chez l'humain dure en moyenne 38 semaines. Le travail pour l'accouchement est caractérisé par des contractions utérines régulières qui mènent à un amincissement de la paroi utérine pour la libération du conceptus. Encore à ce jour, le déclenchement du travail utérin est mal compris. Par contre, il est connu que le mécanisme des contractions utérines est une conséquence de l'augmentation de synthèse de prostaglandine (substance dérivée des acides gras) [5].

1.3 Anatomie et histologie de l'utérus de la ratte

Un modèle animal couramment employé lors de recherches scientifiques a été utilisé lors de cette étude, soit le rat. Le cycle oestral de la ratte (période d'ovulation de celle-ci) a une durée de 4 à 5 jours. Celui-ci est beaucoup plus court que chez les primates [5]. Cette courte durée fait de la ratte un excellent modèle animal dans le domaine de la recherche en reproduction. La ratte a également été choisie pour son court temps de gestation (en moyenne 22 jours). Enfin, l'utérus étant plus volumineux que chez la souris, il est possible d'obtenir plus d'échantillons de tissus. Le système

reproducteur de la ratte est constitué des ovaires, du corps utérin et de deux cornes utérines (Figure 1.2).

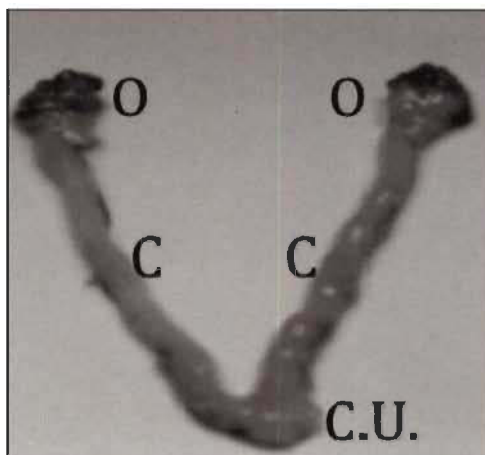


Figure 1.2 Système reproducteur de la ratte (photo du laboratoire du Dr Asselin).
O = Ovaire; C = Corne utérine; C.U. = Corps utérin.

Le corps utérin est composé du myomètre (tissu musculaire lisse) et de l'endomètre (muqueuse) qui constitue la paroi interne. L'endomètre est composé d'une autre couche de cellules épithéliales et une autre de cellules stromales, qui est parsemée de glandes (Figure 1.3) [5].

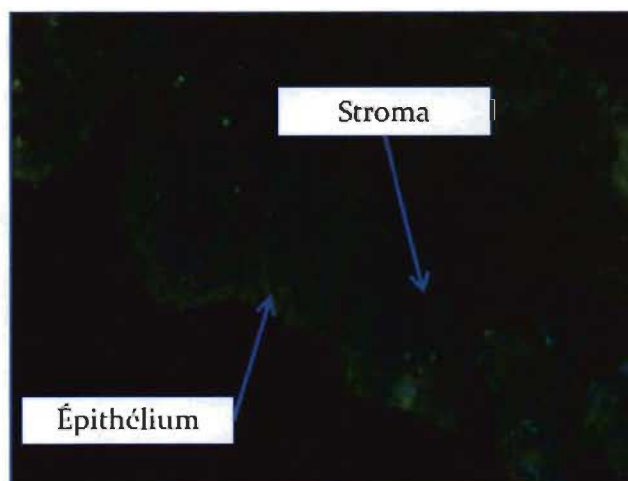


Figure 1.3 Histologie de l'endomètre de ratte (photo du laboratoire du Dr Asselin).
Photo prise au grossissement 40X.

1.4 Cycle œstral de la ratte

Le cycle œstral, qui a une durée de 4 à 5 jours, est caractérisé par 4 stades : le dioestrus (6 h), le proestrus (précoce 60 h; tardif 12 h), l'oestrus (10 à 20 h) et le metoestrus (8 h) [7].

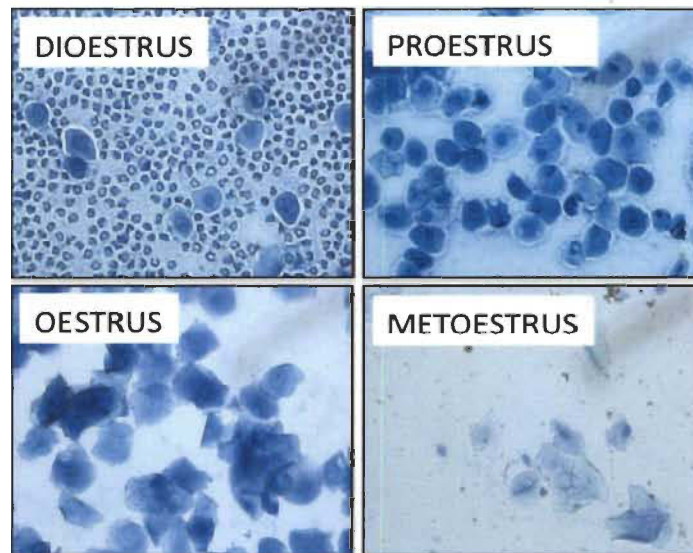


Figure 1.4 Cycle œstral de la ratte (photo du laboratoire du Dr Asselin). Photo prise au grossissement 10X.

Chaque stade du cycle est caractérisé par une histologie distincte (Figure 1.4). Le dioestrus est reconnu par la présence de leucocytes polymorphonucléaires. Le proestrus précoce possède une histologie composée de leucocytes polymorphonucléaires, de cellules nucléées, de cellules épithéliales cornifiées et de mucus, alors que le proestrus tardif est composé seulement de cellules nucléées. Au commencement de l'oestrus, il y a présence de quelques cellules nucléées et de cellules cornifiées qui dominent à la fin de ce stade. Le metoestrus possède sensiblement les mêmes caractéristiques que le proestrus précoce, à l'exception du mucus qui n'est pas présent [7]. C'est seulement dans le stade tardif du proestrus que le succès d'une fécondation est possible.

L'accouplement chez les rongeurs se fait normalement durant la nuit. La confirmation de la gestation chez la ratte se fait par la présence de queues et de têtes de spermatozoïdes dans l'analyse de l'histologie des frottis vaginaux faits le lendemain. La

pseudogestation est confirmée chez la ratte par la présence d'un bouchon vaginal dans le corps utérin de celle-ci suite à un accouplement avec un mâle vasectomisé. D'un point de vue hormonal, le cycle œstral de la ratte est sensiblement affecté de la même façon par la progestérone et l'oestrogène que chez l'humain [4].

1.5 Gestation et pseudogestation chez la ratte

La gestation chez la ratte a une durée moyenne de 22 jours. Les principales étapes sont l'implantation (jour 5), la décidualisation (jour 10), la régression déciduale (jour 14) et la parturition (jour 22). Afin de voir l'impact de l'embryon sur l'endomètre utérin, il est pertinent de comparer la gestation et la pseudogestation. La pseudogestation est caractérisée par un changement hormonal similaire à celui de la gestation. Par contre, il y a absence d'embryon dans l'utérus. L'endomètre est donc seulement affecté par les facteurs maternels et non embryonnaires. La pseudogestation peut être induite naturellement (mâle vasectomisé) ou par injection d'oestrogène qui imite un changement hormonal naturel [8, 9].

1.5.1 Implantation embryonnaire

Durant les 24 à 48 heures précédant l'implantation, les blastocystes se disposent tout le long des cornes utérines. Cette distribution est accomplie grâce au mouvement du myomètre. L'implantation embryonnaire qui s'en suit est une séquence d'évènements complexes qui débute par l'attachement du blastocyste aux cellules épithéliales de la paroi utérine (Figure 1.5). L'attachement à la paroi utérine se faisant dans la partie opposée du mésomètre (artère pour le corps utérin), l'implantation est donc dite antimésométriale. L'orientation du blastocyste, suite à son attachement à la paroi, respecte la position de la masse cellulaire interne qui est face au mésométrium. Il a été proposé que lors de l'implantation de l'embryon dans la paroi, les cellules épithéliales perdent leur polarité apicobasale, afin de permettre l'attachement et l'invasion.

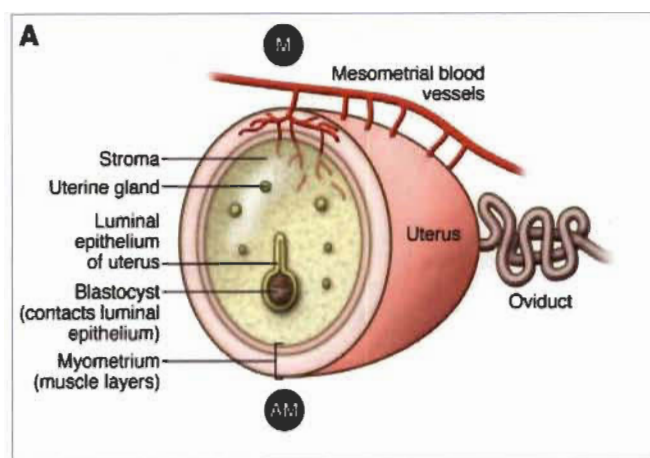


Figure 1.5 Orientation du blastocyste lors de l'implantation [10]. M = mésomètre; AM = antimésométrial.

Après l'attachement, le trophoblaste pénètre dans la paroi utérine (Figure 1.6). Enfin, suite à l'invasion, le tissu subépithélial entourant le trophoblaste, principalement composé de cellules stromales, se transforme en tissu décidual (section 1.5.2) [11].

Il a été observé que les cellules présentes au site d'implantation possèdent des caractéristiques morphologiques de cellules mortes par apoptose [12]. Ces caractéristiques sont, entre autres, la condensation de la chromatine, la fragmentation nucléaire, le bourgeonnement et la fragmentation des cellules. Les cellules avoisinantes effectuent la phagocytose des corps apoptotiques [12].

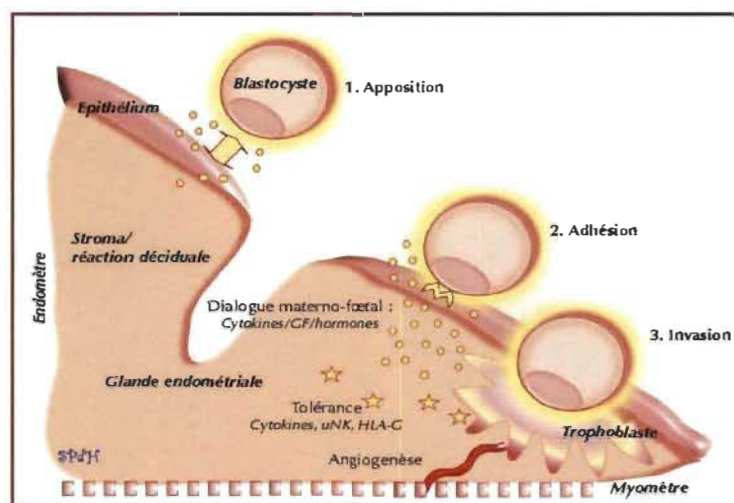


Figure 1.6 Implantation embryonnaire dans la paroi utérine chez l'humain [13].

Au niveau hormonal, l'adhésion du blastocyste à l'endomètre et la continuation de l'implantation seraient dues à la sécrétion d'œstrogène. Celle-ci joue un rôle dans la préparation de l'endomètre pour la progestérone. Une déficience en œstrogène cause un retard d'implantation et un retard dans le développement embryonnaire qui s'arrête au moment de l'apposition à la paroi [14]. Aussi, le maintien de la gestation chez les mammifères requiert le bon fonctionnement du corps jaune qui sécrète de la progestérone. Celle-ci permet à l'endomètre de poursuivre le développement embryonnaire, l'implantation et la placentation [14]. La progestérone aide également à conserver la proximité entre la paroi utérine et le blastocyste.

Également, différentes protéines, telles que certaines lectines (protéines qui se lient à certains sucres), subissent des changements lors de l'implantation. Celles-ci modifient leur liaison avec la surface des cellules lors de la période d'attachement embryonnaire [11]. Également, la production d'interféron par le trophoctoderme, qui joue un rôle dans la reconnaissance de la gestation, est modifiée. Les interférons affectent la réceptivité utérine, la décidualisation et le développement placentaire chez les rongeurs [15].

1.5.2 La décidualisation

Après l'implantation, une autre phase critique de la gestation est la décidualisation. La décidualisation consiste, en majeure partie, à la modification de la structure, de l'organisation et du métabolisme des cellules stromales de l'endomètre connexes au trophoblaste. Ces cellules, après leur transformation en cellules déciduales, forment un tissu nommé décidua (Figure 1.7). La décidualisation comprend plusieurs particularités importantes. D'abord, les cellules stromales de l'endomètre (spécifiquement localisées autour du site d'implantation) doivent être préparées par les stéroïdes ovariens. Ensuite, la décidualisation se fait seulement à une période précise de la gestation et de la pseudogestation, soit vers le dixième jour chez la ratte. Enfin, ce phénomène peut se faire artificiellement ou non. Dans les deux cas, celui-ci engendra la formation d'un nouveau tissu chez l'adulte [11].

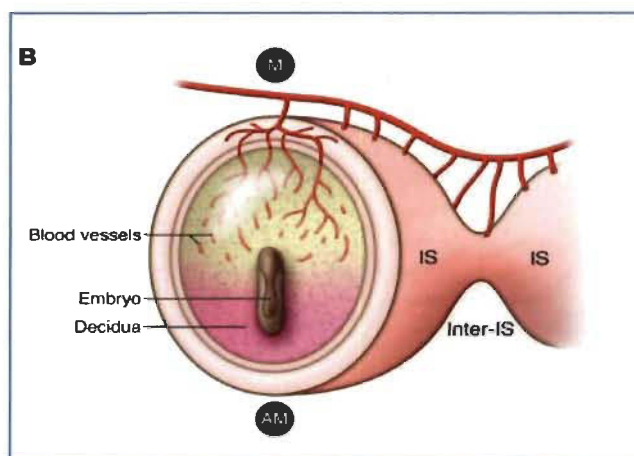


Figure 1.7 Formation du décida entourant l'embryon [10]. M = mésométrial; AM = antimésométrial; IS = Site d'implantation.

La première modification observée dans les cellules stromales est la réorganisation du nucléole. Le phénotype de ce changement est caractérisé par une augmentation de la taille et un arrondissement des cellules stromales. L'espace intercellulaire diminue. Par la suite, les cellules impliquées augmentent leur contenu en organelle qui sera responsable de la synthèse de macromolécules. Une augmentation de lipides, de glycogènes et de filaments intermédiaires est donc observée. Pour finir, les cellules du décida mettent en place des jonctions intercellulaires (particulièrement des jonctions gap) afin de finaliser la formation du nouveau tissu [11].

Lors de la période prédéciduale, il est possible d'observer d'autres types de cellules. Des macrophages et des leucocytes peuvent être retrouvés parmi les cellules prédécidualisées, mais pas autour des cellules matures [11].

L'évolution du tissu décidual se termine par la mort de ses cellules. L'apoptose (mort cellulaire programmée) serait le mécanisme responsable de la mort de celles-ci. Cette étape dans la gestation se nomme régression déciduale. Les cellules trophoblastiques géantes phagocytent les corps apoptotiques, créant ainsi un espace pour le développement du trophoblaste présent. L'apoptose, telle que décrite dans la section 1.6, joue un rôle primordial dans cette étape clé de la grossesse.

1.5.3 La parturition

La parturition, qui est la phase finale de la grossesse, est l'évacuation naturelle du fœtus, du placenta et des autres membranes gestationnelles de l'utérus. Le travail d'accouchement peut se diviser en quatre stades. La phase un, soit la grossesse, est la période où l'utérus est dans un état de repos induit par des inhibiteurs. La deuxième phase se produit peu de temps avant l'accouchement. Cette phase est dite d'activation, car l'œstrogène présent active la synthèse de protéines responsables des contractions (récepteur à prostaglandines, canaux sodiques, etc.). La phase trois est dite de stimulation. Les prostaglandines et l'ocytocine stimulent les contractions utérines et la dilatation du col jusqu'à la période d'expulsion du fœtus et du placenta [16]. L'activation accrue des prostaglandines lors de la période de travail est le résultat de cyclooxygénase (COX-1 et de COX-2) exprimé au niveau des cellules utérines [5]. La quatrième phase est dite d'involution. Celle-ci est la période du maintien des contractions pour l'homéostasie du post-partum et la réduction du volume de l'utérus [16].

1.6 L'apoptose

L'apoptose est un phénomène clé de mort cellulaire programmée qui survient à la fois lors de l'implantation et de la régression déciduale. L'apoptose est caractérisée par plusieurs changements morphologiques et biochimiques dont la fragmentation de l'ADN, la condensation de la chromatine, un rétrécissement des cellules et un bourgeonnement au niveau des membranes cellulaires. Également, plusieurs protéines comme les caspases, qui sont spécifiques à l'apoptose, sont régulées lors de ce phénomène [17].

1.6.1 Les caspases

Les caspases sont des enzymes protéolytiques. Lorsque celles-ci sont activées, le phénomène d'apoptose est déclenché. Ces protéases utilisent les cystéines comme

groupement nucléophile pour le clivage du substrat et coupent les liens peptidiques du côté C-terminal pour les résidus d'acide aspartique. Ces protéines sont synthétisées sous forme de proenzyme inactive et requièrent un processus protéolytique, au niveau d'un résidu d'acide aspartique, afin d'être actives [17]. Dans la cascade d'activation des caspases, certaines caspases en clivent d'autres de façon à les activer (Figure 1.8).

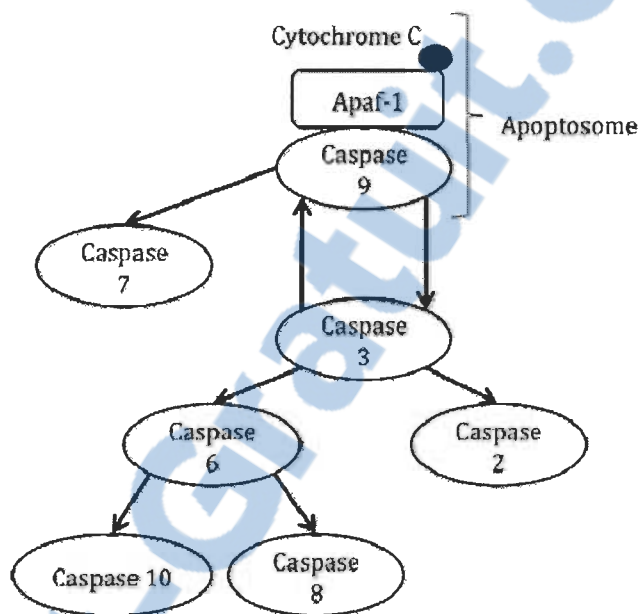


Figure 1.8 Cascade d'activation des caspases.

1.6.2 Voie de signalisation

Il existe deux voies de signalisation cellulaire par lesquelles les caspases peuvent être activées afin d'accomplir l'apoptose : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. La voie extrinsèque implique les récepteurs de mort cellulaire et leur ligand. Les principaux acteurs de cette voie sont le ligand Fas (FasL) et son récepteur (FasR) et le *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) et ses récepteurs (TNFR1 et TNFR2). La voie intrinsèque comprend quant à elle la liaison du cytochrome C (relâché de la mitochondrie) à Apaf-1, qui permettra l'activation de cette dernière [18]. Ce complexe se joint ensuite à la caspase-9 pour former un large complexe qui se nomme apoptosome. Enfin, l'apoptosome va induire l'activation des autres caspases (Figure 1.9) [17].

La famille protéique BCL-2 contrôle l'initiation de la voie intrinsèque et régule les récepteurs de mort cellulaire impliqués dans la voie extrinsèque [17]. Cette famille de protéine comprend des protéines anti-apoptotique (Bcl-2, Bcl-x_L) et pro-apoptotique (Bax, Bid, Bad). Chacune d'elles possède un des quatre motifs BH (Bcl-2 Homology domain) qui est nécessaire à son activité respective. La formation de complexes leur permet de contrôler la balance entre les facteurs de survie et de mort cellulaire (Figure 1.9) [19].

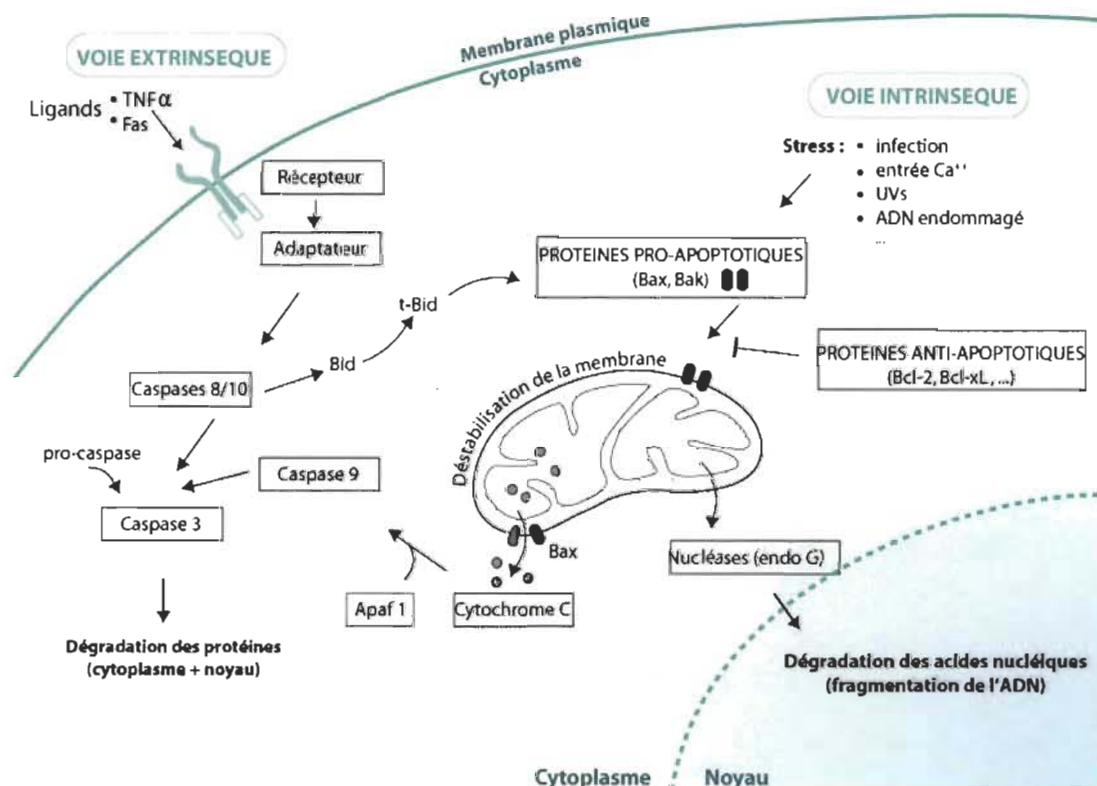


Figure 1.9 Voie extrinsèque et intrinsèque du phénomène d'apoptose dans une cellule [20].

L'apoptose est également contrôlée par une autre famille de protéine, les IAPs (inhibiteur apoptotique). Les IAPs sont des protéines qui fonctionnent de façon intrinsèque dans la cascade des caspases [21]. Le contrôle de l'expression de ces protéines influence la mort cellulaire dans différents contextes, tel que lors de désordres neurodégénératifs, de désordres d'hyperproliférations, etc. Les protéines de la famille des IAPs sont classées comme étant des ubiquitines ligases. Celles-ci régulent la survie cellulaire en orchestrant les modifications d'ubiquitination.

1.7 Le Transforming growth factor- β (TGF- β)

Le TGF- β est une cytokine qui est impliquée dans la régulation de la différenciation cellulaire, dans la prolifération et dans la régénération tissulaire [22]. Le TGF- β aurait donc un rôle dans la régulation moléculaire des événements de la reproduction. Il existe trois isoformes, soit le TGF- β 1, le TGF- β 2 et le TGF- β 3. Les trois isoformes sont très similaires dans leur séquence d'acide aminé et leur structure tertiaire [23].

1.7.1 Signalisation cellulaire par les TGF- β

Le TGF- β est un facteur de croissance. Lorsqu'il est sécrété de la cellule, celui-ci se trouve sous forme latente. Cette forme latente est composée du TGF- β , d'un peptide nommé « latency-associated peptide » (LAP) et d'un large complexe protéique lié au TGF- β . Ce large complexe protéique est impliqué dans la sécrétion, l'entreposage extracellulaire et l'activation du TGF- β . Le relâchement de la forme active du TGF- β est un facteur limitant dans son activité biologique. De façon naturelle, le TGF- β est activé par des enzymes. Les protéases responsables du relâchement de la forme active sont les plasmines, les cathepsines B et D, les calpaines et les glycosidases. Il existe deux types de récepteurs transmembranaires: le T β -RI et le T β -RII. Ces deux récepteurs possèdent un site sérine/thréonine kinase du côté du cytosol qui permet la transduction du signal à l'intérieur de la cellule impliquée [23].

Les protéines Smads ont été identifiées comme étant les principaux transducteurs de la voie de signalisation des TGF- β . Celles-ci font la médiation entre le signal provenant des récepteurs membranaires et certains gènes cibles dans le noyau. Il existe neuf protéines Smad identifiées et celles-ci sont distribuées dans trois classes. La première classe comprend les Smads responsables de la régulation au niveau des récepteurs (Smad 1, 2, 3, 5 et 8). La deuxième comprend les Smads initiateurs de la collaboration (Smad4 et Smad4B). La dernière classe comprend les Smads inhibiteurs (Smad 6 et 7) [24]. La famille des Smads peut se faire activer par une voie dépendante ou par une voie indépendante du TGF- β . Dans la voie dépendante, le TGF- β se lie au

récepteur de type II qui va former un complexe hétérotétramérique avec le récepteur de type I. La formation du complexe va activer Smad2 qui va se joindre à Smad3. Ce nouveau complexe va ensuite se lier à la co-Smad4 afin de migrer dans le noyau. La voie indépendante permet également l'activation des Smads puisqu'elle comprend diverses kinases aptes à phosphoryler cette famille. MAP kinases p38, ERK ½, Jnk, rho-associated kinase (ROCK), cyclin-dependent kinase (CDK) sont toutes des kinases qui peuvent activer Smad2 [25].

1.7.2 Le TGF-β dans la gestation

Chaque isoforme ne répond pas de la même façon aux hormones stéroïdiennes. Suite à des traitements d'œstradiol sur des cellules stromales, celles-ci augmentent la régulation du TGF-β1 et augmentent l'expression d'ARN de TGF-β3. Par contre, pour le même traitement, la production de TGF-β2 est inhibée [23]. Dans le domaine de la reproduction, les trois isoformes de TGF-β possèdent différents rôles. L'isoforme TGF-β1 serait exprimé dans l'épithélium utérin durant la période de l'implantation afin de permettre l'attachement du blastocyste [23, 26]. Pour sa part, l'isoforme TGF-β3 serait davantage impliqué dans la régulation des différents événements en début de gestation [23]. En somme, la voie des TGF-β est considérée comme un signal dans l'endomètre qui est capable de contrôler l'invasion du trophoblaste durant l'implantation et la placentation [26]. Il est également connu que le TGF-β induit l'apoptose dans les cellules stromales de l'endomètre de ratte [27]. Une étude portant sur l'impact du TGF-β dans une culture de cellules déciduales a démontré que des traitements au TGF-β diminuait la phosphorylation d'Akt et l'expression de XIAP [9], contrôlant ainsi l'apoptose.

1.8 La voie de signalisation PI3-K/Akt

La voie de signalisation PI3-K/Akt (Figure 1.10) est impliquée dans l'équilibre entre l'apoptose et la prolifération cellulaire. La protéine phosphatidylinositol-3 (PI3) kinase est une kinase lipidique qui phosphoryle le phosphatidylinositol-3-phosphate

(PIP2) ancré à la membrane plasmique. Il existe divers facteurs extracellulaires qui peuvent activer la PI3-K, par exemple l'insuline et certains facteurs de croissance. La stimulation par l'insuline résulte à un recrutement à la membrane de cette kinase. La PI3-K peut par la suite effectuer la phosphorylation de son substrat [28].

1.8.1 Signalisation cellulaire de la voie

Lorsque le PIP3 est formé, la kinase PDK est recrutée à la membrane et celle-ci permet l'activation d'Akt. Comme mentionné plus haut, il a été démontré que, lors de traitements de TGF- β dans une culture de cellules déciduales, la phosphorylation d'Akt était diminuée ainsi que l'expression de XIAP [9]. Une interaction entre la voie du TGF- β et la voie PI3-K/Akt est donc envisageable.

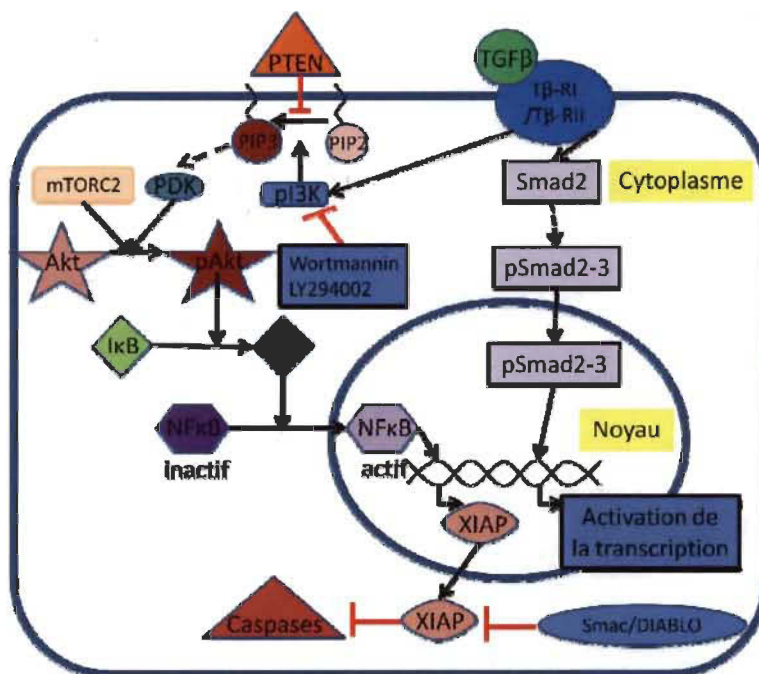


Figure 1.10 Voie de signalisation PI3K/Akt en parallèle avec la voie des TGF- β .

1.8.2 Akt dans la gestion

Akt (ou PKB) est une sérine/thréonine kinase qui est reconnue pour être une protéine polyvalente. L'activité de cette protéine est principalement induite par la PI3-K

en réponse à des stimuli extracellulaires. Dans ce processus, Akt est recrutée à la membrane et peut se faire phosphoryler sur deux sites activateurs, soit sur la thréonine 308 et sur la sérine 473. Cette phosphorylation peut se faire par la *phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1) et par la *mammalian target of rapamycin complexe 2* (mTORC2) (Figure 1.10). Suite à son activation, Akt est distribuée dans la cellule afin de réguler diverses fonctions cellulaires [29], telles que la croissance, la survie, le métabolisme et la prolifération cellulaire (Figure 1.11).

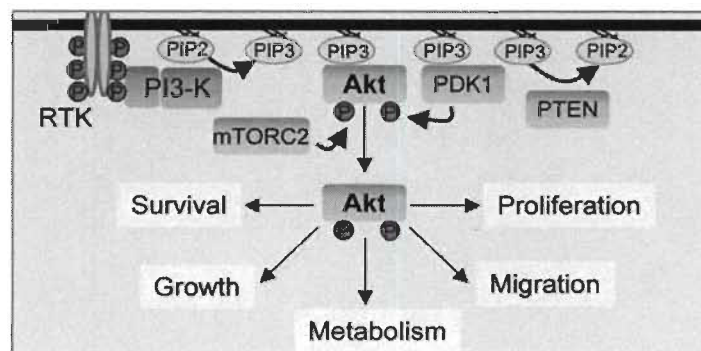


Figure 1.11 Rôles d'Akt lorsqu'elle est activée [29].

Il existe trois isoformes d'Akt, soit Akt1, Akt2 et Akt3. Les deux dernières possèdent respectivement 81 % et 83 % d'homologie avec Akt1 [30]. La grande diversité d'activités de cette kinase serait due à l'activité spécifique de chaque isoforme. Akt1 serait davantage impliquée dans la survie cellulaire. Akt2 jouerait plus un rôle dans l'homéostasie du glucose et Akt3 agirait plus dans le développement du cerveau. La combinaison de différents isoformes donnerait également divers résultats. Une étude récente a démontré que des souris doubles mutantes pour Akt1 et Akt3 sont létales au niveau embryonnaire [31]. Il existe différentes suggestions de mécanisme qui permettrait aux isoformes d'Akt d'être spécifiques. Une distribution des isoformes dans les tissus, une stimulation dominante, une activité intracellulaire particulière, un facteur qui place la cellule dans un contexte précis, etc. sont tous des mécanismes possibles qui permettraient à Akt d'être isoforme spécifique (Figure 1.12).

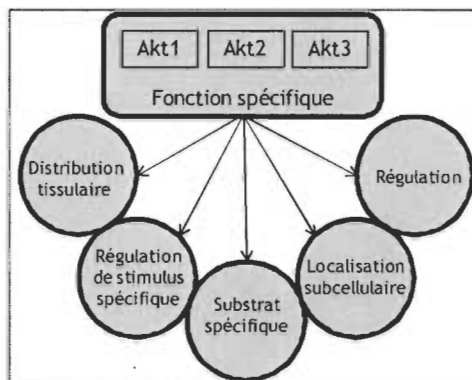


Figure 1.12 Mécanisme potentiel qui permettrait la fonction spécifique de chaque isoforme d'Akt.

Au niveau de la reproduction, Akt est une kinase œstrogène dépendante. L'œstradiol affecte directement la voie de PI3-K/Akt en augmentant la phosphorylation d'Akt dans les cellules endométriales. L'œstradiol affecte donc la prolifération et l'effet anti-apoptotique par un mécanisme non génomique via la voie d'Akt [32]. Également, Akt serait impliqué dans la survie cellulaire et dans la modulation de la matrice extracellulaire de l'endomètre. Akt serait activée lors des menstruations, lors de l'implantation embryonnaire et lors de la décidualisation chez l'humain [33, 34]. Toutefois, la régulation spécifique des isoformes d'Akt dans ces processus demeure à être investiguée.

1.8.3 Régulation de l'apoptose par XIAP et Smac/DIABLO

Suite à l'activation d'Akt, diverses protéines sont modulées. Le *X-linked inhibitor of apoptosis* (XIAP) est une protéine inhibitrice de l'apoptose et fait partie de la famille des IAP (inhibitor of apoptosis protein). XIAP inhibe l'apoptose en se liant directement aux caspases qui exécutent ce phénomène (Figure 1.10). Il a été démontré récemment qu'Akt pouvait prévenir l'ubiquitination et la dégradation de XIAP en phosphorylant celle-ci à la fois *in vitro* et *in vivo* [35, 36]. Le TGF- β engendrerait également la mort cellulaire par une diminution de XIAP [1]. Il est admis que des traitements de TGF- β 2 et de TGF- β 3 engendrent une diminution de la phosphorylation d'Akt, mais aussi une diminution de l'expression protéique de XIAP dans une culture primaire de cellules déciduales [9].

Afin de permettre l'apoptose lors de l'implantation ou lors de la régression déciduale, il faut enlever l'inhibition des IAP sur les caspases. La protéine *second mitochondria-derived activator of caspases (Smac)/ Direct IAP-Binding protein with low pI* (DIABLO) se lie au site actif des IAPs. La liaison de Smac/DIABLO aux protéines de la famille IAP empêche donc l'inhibition des caspases, ce qui active l'apoptose. Suite à un stress cellulaire, cette protéine pro-apoptotique est libérée des mitochondries. En même temps, le cytochrome C est libéré, ce qui permet à la voie intrinsèque de générer des caspases actives [37].

Une étude récente a démontré, suite à une expérimentation avec des ARN d'interférences, que l'induction de la régulation de XIAP par la phosphorylation d'Akt est dépendante de PTEN. XIAP peut interagir avec PTEN en réponse à des stimuli physiologiques. L'interaction mène à une ubiquitination de PTEN qui agit sur l'activation d'Akt [38].

Dans le domaine de la reproduction, il a été démontré que lors de traitements d'oestradiol chez la ratte, la régulation de XIAP et de Smac/DIABLO se fait de manière opposée. Les traitements engendrent une augmentation de l'expression de XIAP et une diminution de l'expression protéique de Smac/DIABLO [39].

1.8.4 Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN)

Il est connu que PTEN est un suppresseur de tumeurs. Celui-ci est un lipide phosphatase qui est responsable de la déphosphorylation du PIP3 (phosphatidylinositol 2-3-phosphate). Cette déphosphorylation mène au PIP2. PTEN est donc un antagoniste de la PI3-K qui phosphoryle le PIP2 en PIP3 (Figure 1.10). La déphosphorylation du PIP3 engendre différents impacts sur des protéines qui possèdent des rôles distincts dans la survie cellulaire ou la traduction protéique [40, 41]. Par exemple, la protéine Rac GEF, qui agit au niveau du cytosquelette et de la mobilité cellulaire, se fait moduler par le PIP3 [40]. L'activité de PTEN peut être régulée de deux façons : par sa localisation et par sa phosphorylation. Comme présenté plus haut, XIAP est apte à réguler

l'ubiquitination, la quantité et la localisation de la protéine PTEN [38]. Il a été démontré que PTEN peut se retrouver au niveau de la membrane plasmique, dans le cytosol et dans le noyau. La localisation de cette protéine est donc un facteur limitant pour son activité (déphosphorylation de son substrat) [40]. La phosphorylation de PTEN dans son extrémité C-terminale a été identifiée pour stabiliser cette protéine, mais aussi pour réduire son activité [40]. Enfin, l'expression de PTEN peut également être modulée afin de contrôler son activité. Il a été démontré que dans des cellules stromales en culture, des traitements de progestérone engendrent la stimulation de l'expression de PTEN [41].

1.8.5 *IκB et NFκB*

Il a été démontré qu'Akt est capable de réguler l'activation du Nuclear Factor κB (NFκB). Dans les cellules immunitaires, NFκB est un facteur nucléaire qui est responsable d'une augmentation d'expression d'une variété de molécules impliquées dans l'inflammation, telles que des cytokines et des molécules d'adhésion. NFκB peut permettre l'expression des gènes de facteurs anti-apoptotique tels que c-IAP1 et c-IAP2 [42]. L'expression de NFκB peut se retrouver dans des cellules immunitaires, mais aussi dans des cellules non immunitaires.

NFκB est une protéine constituée de différentes sous-unités, dont la sous-unité, p65, p50 et c-Rel. Une étude a démontré que dans des cellules endométriales, la sous-unité p65 est grandement exprimée et possède une forte localisation nucléaire. La sous-unité p65 est susceptible de réguler l'expression des cytokines et donc d'agir dans la survie cellulaire. Ceci suggère une possibilité de régulation endocrine par NFκB dans l'endomètre [41].

Afin d'éviter une surexpression génique, la translocation au noyau du facteur de transcription (NFκB) est limitée par la protéine Inositol- $I\kappa B$ ($I\kappa B$). Celles-ci forment un complexe qui empêche l'entrée dans le noyau [41]. Afin d'activer NFκB, la kinase Akt phosphoryle $I\kappa B$. Cette phosphorylation permet la dissociation du complexe $I\kappa B$ -NFκB et permet ainsi la translocation au noyau de NFκB (Figure 1.10).

Il existe différents mécanismes mis en place afin d'inactiver NFκB. Certains impliquent des hormones stéroïdiennes. La synthèse d'IκB, la compétition entre les récepteurs stéroïdiens et l'interaction physique entre les récepteurs stéroïdiens et NFκB en sont des exemples [41]. La régulation négative entre NFκB et les hormones stéroïdiennes est importante au niveau biologique. Celle-ci régule différentes réponses physiologiques, telles qu'observées dans l'endomètre. Il a été prouvé que les récepteurs à oestrogène-α et -β (ER-α et ER-β) inhibent l'affinité à la sous-unité p65 l'empêchant ainsi de se lier à l'ADN. NFκB est aussi inhibée par la progestérone, car celle-ci stimule la synthèse d'IκB qui retient NFκB dans le cytosol [41]. Une étude qui porte sur l'expression de NFκB dans l'endomètre humain lors du premier trimestre a démontré une augmentation des ARN de IκB lors de phase prémenstruelle. La progestérone prémenstruelle inhibe donc NFκB [43]. En somme, NFκB régule l'expression de différentes molécules importantes pour l'implantation. Son activité est associée au succès de la gestation, et modulée par les hormones stéroïdiennes.

1.9 Hypothèse/Objectif

D'abord, le TGF-β est impliqué dans le déclenchement de l'apoptose dans des cellules déciduales en culture chez le rat et l'humain. Aussi, celui-ci est un facteur libéré par le conceptus qui pourrait affecter les cellules endométriales. Enfin, la voie de signalisation PI3-K/Akt joue un rôle dans l'équilibre entre la survie cellulaire et l'apoptose. L'hypothèse de la présente étude est que les isoformes d'Akt (Akt1, Akt2 et Akt3) de la voie PI3-K/Akt, en lien avec la voie des TGF-β, jouent un rôle important dans les différentes étapes de la gestation chez la ratte, soit lors de l'implantation, la régression déciduale et la parturition.

Les objectifs de l'étude ont été la caractérisation de l'expression des différents isoformes lors de la gestation et lors de la pseudogestation chez la ratte. Aussi, la caractérisation de différentes protéines de la voie PI3K/Akt a été faite. Afin de vérifier le rôle d'Akt au moment de l'implantation, une inhibition de la PI3K à l'aide de wortmannin a été faite *in vivo*. Également, des traitements *in vitro* au LY294002 ont été

faits sur des cellules déciduales en culture afin de voir l'impact de l'inhibition d'Akt. Enfin, l'impact sur l'expression des différentes protéines de la voie a été vérifié lors de ces traitements.

Rapport-Gratuit.com

CHAPITRE II

REGULATION OF THE PI3-K/AKT SURVIVAL PATHWAY IN THE RAT ENDOMETRIUM

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue *Biology of Reproduction*, sous la référence :

Veillette A, Grenier K, Brasseur K, Fréchette-Frigon G, Leblanc V, Parent S, Asselin E. Regulation of the PI3-K/Akt survival pathway in the rat endometrium. *Biology of Reproduction* (2013) 88(3):79. DOI 10.1095/biolreprod.112.107136

2.1 Résumé de l'article

Les phénomènes d'apoptose et de survie cellulaire sont impliqués dans le processus d'attachement de l'embryon à l'endomètre maternel. À la fin de l'implantation, la décidualisation commence et est suivie de la régression déciduale au jour 14. L'apoptose est également présente lors de ce phénomène. Ces deux étapes de la gestation sont critiques pour le succès du maintien de la grossesse. La voie de signalisation PI3-K/Akt et le *transforming growth factor-beta* (TGF- β) sont reconnus pour jouer un rôle dans le contrôle de l'apoptose. L'objectif de la présente étude est de caractériser la voie PI3-K/Akt en lien avec la voie des TGF- β dans l'endomètre de ratte en gestation. Les rattes ont été euthanasiées aux deux jours de la gestation (J1-J22 et *Post-partum*) et aux deux jours de la pseudogestation (J1 – J9). L'endomètre utérin a été récolté à ces jours. Il est possible d'observer que pAkt augmente au jour 5 et au *post-partum*. Seul l'isoforme Akt3 est phosphorylé à ces deux temps de la gestation démontrés ici par une immunoprécipitation. La wortmannin, inhibiteur de la PI3-K, a réduit l'activation d'Akt, diminué la phosphorylation de Smad2 et l'expression de XIAP *in vivo*. Le LY294002, autre inhibiteur de la PI3-K, a diminué également pAkt et l'expression de XIAP *in vitro*. Ces résultats suggèrent qu'Akt régule l'expression de XIAP et que ceux-ci pourraient être d'importante molécule qui régule l'apoptose dans l'endomètre de ratte. Également, la voie PI3-K/Akt est impliquée en coopération avec la voie des TGF- β dans les processus essentiels de la gestation, ce qui permet de protéger le développement du *conceptus*.

2.2 Article

Regulation of the PI3-K/AKT survival pathway in the rat endometrium[†]

Annabelle Veillette, Kathy Grenier, Kevin Brasseur, Guylaine Fréchette-Frigon, Valérie Leblanc, Sophie Parent, and Eric Asselin*

Department of Medical Biology, Research Group of Oncology and Molecular Endocrinology, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

Short title: Akt survival pathway in the rat endometrium

Key words: Phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, TGF- β , PTEN, XIAP, NF- κ B

Summary Sentence: Akt isoforms are differently regulated in the endometrium during rat pregnancy.

[†] This work has been supported by a grant from NSERC (238501-01). Eric Asselin is holder of the Canada research chair in Molecular Gyneco-oncology. We are grateful to Mrs Nadia Desnoyers for her precious time and expertise to our animal projects.

* Corresponding Author: Eric Asselin, Ph.D.
Department of Medical Biology
Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500
Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7
E-mail: Eric.Asselin@uqtr.ca

ABSTRACT

The occurrence of apoptosis and cell survival in the receptive uterus is intimately involved in the embryo implantation process in order to facilitate embryo attachment to the maternal endometrium. The initial stimulus leading to successful implantation might be triggered by the conceptus itself. By the end of rat embryo implantation, decidualisation begins followed by the regression of the decidua basalis (DB) on day 14. The PI3-K survival pathway and TGF- β have been thought to play a role in this process. The objective of the present study was to investigate the regulation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K)/PTEN/Akt pathway in the rat endometrium during pregnancy. Rats were killed at different days of pregnancy (day 1 to 22 and postpartum) or pseudopregnancy (day 1 to 9) and uteri were removed to collect endometrial tissues. The active form of Akt (pAkt) was increased at day 5 of pregnancy and at day 3 of pseudopregnancy as well as at day 12 of pregnancy and at day 1 postpartum. Of the three Akt isoforms (Akt1, Akt2 and Akt3), Akt3 was the only isoform phosphorylated at day 5 during the implantation process and postpartum time as demonstrated by immunoprecipitation studies. PI3-K inhibition *in vivo* blocked Akt phosphorylation, reduced Smad2 phosphorylation and reduced both TGF- β 2 and XIAP expression. PI3-K inhibition in cultured decidual cells led to inhibition of pAkt and decrease XIAP expression. These results suggest that Akt and XIAP may be important surviving signaling molecules by which apoptosis is regulated in the rat endometrium during pregnancy and that TGF- β could be linked to this process.

INTRODUCTION

The balance between cell survival and death is crucial for successful implantation and maintenance of pregnancy [1]. On about the 4th day of development, the embryo begins to implant in the endometrium of the rodent uterus. A progressive degree of proximity between trophoblast and endometrial epithelium occurs until the epithelial cells undergo apoptosis and detach from the basal membrane [2]. After that, estrogen and progesterone will induce decidualization of the endometrial stromal cells [3]. A second wave of

apoptosis occurs around day 14 of pregnancy in the decidua basalis (DB) [3], a process called DB regression. In pseudopregnant rats, decidual reaction can occur in response to artificial stimuli; the absence of embryo suggests that these morphological and physiological changes that are made to accommodate the developing conceptus results from an intrinsic uterine cell signaling. We have previously demonstrated that TGF- β might be involved in triggering apoptosis during implantation and DB regression through the inhibition of Akt phosphorylation to allow trophoblast invasion [4, 5]. However, the specific intracellular mechanisms controlling the signaling pathways involved in transcription of key genes involved throughout the pregnancy are not fully understood.

Transforming growth factor beta (TGF- β) is a pleiotropic cytokine which regulates proliferation, differentiation and invasiveness. The TGF- β s isoforms (TGF- β 1, TGF- β 2, and TGF- β 3) can activate TGF- β receptors (T β RI, T β RII, and T β RIII) [6, 7] and trigger downstream transcriptional responses [8] which can lead to apoptosis [5]. TGF- β signaling pathway involves cell surface receptors and gene regulation by Smads transcription factors [9]. For nuclear translocation, phosphorylation of Smads is essential and kinases that are known to phosphorylate Smads include MAP kinase, Jnk and cyclin-dependent kinase (CDK) [10]. More recently, we showed that TGF- β signaling pathway can promote apoptosis through the modulation of the PI3-K/Akt pathway by down-regulating the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) [5, 11]. Akt is a serine/threonine protein kinase that plays a central role in the PI3-K/Akt survival pathway. It is recruited to the plasma membrane and activated by phosphorylation at threonine 308 and serine 473 in response to growth factors and cytokines through PI3-kinase [12], a process negatively regulated by the PTEN PIP3 phosphatase. To date, three isoforms of Akt have been identified: Akt1, Akt2 and Akt3. Akt2 and Akt3 have 81% and 83% homology in amino acid sequences with Akt1, respectively [12]. Once phosphorylated, Akt activates the cell survival pathway through phosphorylation of several anti- and pro-apoptotic proteins such as XIAP [13], Prostate Apoptosis Response-4 (Par-4) [14], B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) [15] and HtrA2 [16]. It has also been shown that Akt is involved in the phosphorylation of I κ B kinase (IKK) resulting in

nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) activation and translocation to the nucleus [17]. In the nucleus, NF- κ B can activate the transcription of many genes involved in the process of pregnancy such as prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2) [18], Bcl-2, Bcl-xL, Survivin and XIAP. Once transcribed, XIAP can further block caspases activity. A protein known to inhibit XIAP is second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP Binding Protein with Low pI (Smac/DIABLO) [19]. Under cellular stress, Smac/DIABLO is released from mitochondria to the cytosol to promote caspase activation by binding and neutralizing XIAP [20].

The aim of the present study was to characterize the expression and activity of the Akt survival pathway in the rat uterus throughout the pregnancy particularly at the time of implantation, DB regression and postpartum time.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Blots and histological sections were probed with antibodies against Akt, pAkt (ser 473), Akt1, Akt2, XIAP, PTEN, NF- κ B p65, pI κ B α , cleaved caspase-3, PARP, pSmad2 and Smad2 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), Akt3 (OriGene, Rockville, MD), Smac/DIABLO (Calbiochem, La Jolla, CA), TGF- β 1 (sc-146), TGF- β 2 (sc-90) and TGF- β 3 (sc-82) polyclonal antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, USA). Wortmannin was purchased from Sigma-Aldrich (ON, CA) and LY294002 from Cell Signaling Technology (Danvers, MA).

Animals

Sprague-Dawley female rats, 200-225g, were obtained from Charles River Laboratories Canada. Animals were maintained on standard chow and water, which were available *ad libitum*, in animal facilities illuminated between 6:00 h and 20:00 h. All procedures were performed in accordance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care for

the handling and training of laboratory animals and the Good Health and Animal Care Committee of the Université du Québec à Trois-Rivières. Male and female rats were mated overnight and confirmation of mating was determined by vaginal smears and/or the presence of a vaginal plug (day 1). Pseudopregnancy was induced by caging adult female rats with vasectomized males. Rats were killed and the uteri were collected on days 1, 3, 5, 7 and 9 of early pregnancy and pseudopregnancy in addition to day 12 to postpartum (PP) at 10:00 h in the morning. To determine the effect of the PI3-K pathway during implantation we injected Wortmannin a potent inhibitor of PI3-K at day 4 of pregnancy. Wortmannin (dissolved in 4% methanol in saline, final concentration) was administered intraperitoneally in doses of 1.4 mg/kg. Control animals received a comparable volume of vehicle at the same time. Animals were killed by CO₂ asphyxia at day 5 of pregnancy and uterus were taken for study. Three to four different rats were used for each stage of pregnancy. Endometrial samples were used for analysis.

Decidual cell culture

Uteri from pseudopregnant rats (day 5) were removed and horns taken and immersed in HBSS solution containing HEPES (20 mM), penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 µg/ml) and fungizone (1.25 µl/ml) (Invitrogen, ON, CA). Further manipulations were performed in a sterile environment. The uterine horns were transferred into a sterile Petri dish containing HBSS, slit longitudinally and immersed in trypsin type I solution (0.3%) (Roche Diagnostics, QC, CA) in HBSS and agitated for 60 minutes at room temperature. Uterine horns were then vortexed at maximum speed for 5 seconds and supernatant containing epithelial cells was discarded. Uterine horns were washed three times with 2.5 ml of HBSS and immersed in a HBSS solution containing trypsin type I (0.03%), DNase I (0.016%) and collagenase type II (0.064%) for 15 minutes at 37°C in a water bath. Uterine horns were then vortexed at maximum for 5 seconds. The supernatant containing stromal cells was transferred into a sterile falcon tube containing 150 µl of FBS D.C. (Dextran-Charcoal extracted). Uterine horns were washed two times with 2.5 ml of HBSS and the supernatant was added to the tube containing stromal cells. Uterine horns were discarded and stromal cells were centrifuged at 1000 g for 5 minutes.

Cells were washed two times with HBSS and centrifuged. The supernatant was discarded and cells were resuspended in DMEM-F12 (Invitrogen, ON, CA) containing 2.438 g/L NaHCO₃, 10% FBS D.C. and 50 µg/ml gentamycin. Cells were plated in 6-well plates (Corning plates) at a density of 4x10⁵ cells per well and incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. The medium was changed two hours after the first incubation in order to eliminate unadhered epithelial cells from stromal cell cultures. The purity of stromal cells was more than 97%, as evaluated by cellular morphology and immunofluorescence using an epithelial-specific Keratin 8/18 antibody. Three to 5 days after plating (more than 90% of confluency reached), cells were treated for 24 hours in the presence or absence of increasing doses of LY294002. Total proteins from treated cell cultures were extracted using TRIzol® (Invitrogen, ON, CA). For Western blot analyses, 15 µg of total protein was used.

Protein extraction and Immunoblotting

Endometrial proteins were gently scraped from the uterine tissues and each sample was homogenized in RIPA lysis buffer containing protease inhibitors (Complete Mini Protease Inhibitor, Roche, Laval, Qc, CA) followed by three freeze thaw cycles. Equal amounts of cell lysate were resolved by 8–15% SDS-PAGE and then transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Mississauga, ON, CA). The membranes were probed with primary antibody overnight at 4°C (Akt, pAkt (Ser 473), Akt1-2-3, XIAP, PTEN, Smac /DIABLO, cleaved caspase-3, PARP, NF-κB p65, pIκBα, pSmad2, Smad2, TGF-β1 -β2 -β3 1:1000) and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 45 minutes. Detection was performed using Super Signal West Femto substrate (Pierce, Arlington Heights, IL), as described by the manufacturer.

Immunoprecipitation

Akt1, Akt2 and Akt3 proteins from day 5 and postpartum were immunoprecipitated. Briefly, cells were extracted and lysed in lysis/wash buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40 in PBS, protease complete inhibitor; (Roche)). Lysate was transferred to a syringe pre-chilled on ice and

homogenized 10 times. To remove debris, the homogenized suspension was centrifuged 15 minutes, 13000 rpm at 4°C. Protein A-agarose prewashed bead suspension was added to supernatant and incubated for at least 3 hours at 4°C on a rocking platform. Pre-cleared lysate was centrifuged and specific antibody (Akt1 1:100, Akt2 1:200, Akt3 1:75) was added to supernatant and gently rocked overnight at 4°C. Protein A suspension was added to the prepared samples and incubated 6 hours at 4°C on a rocking platform. Complexes were collected by centrifugation and washed three times. Reducing sample buffer was added to the complexes and the suspension was boiled 3 minutes at 100°C, centrifuged to pellet the supernatant was collected for western blot analysis.

Immunohistochemistry

The uterus was fixed in 4% paraformaldehyde solution and embedded in paraffin. Tissue sections of 7 µm thickness were mounted on polylysine-coated slides. The slides were deparaffinized by heating at 58°C for 30 minutes, followed by two washes in NeoClear solvent (VWR Canlab, Mississauga, ON) and then progressively hydrated with successive washes at room temperature in 100% ethanol, 95% ethanol, and 70% ethanol, and followed by a wash in PBS. After permeabilization for 10 minutes in boiling citrate solution (10mM sodium citrate, 0.05% Tween 20), the tissue slides were washed twice with PBS at room temperature. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxide in water for 10 minutes at room temperature. Tissue sections were incubated with a protein blocking serum-free reagent (Dako Diagnostics, Inc., ON, CA) for 30 minutes to block non-specific binding. The tissues were probed with primary antibodies (Akt, pAkt (Ser 473), NF-κB, pSmad2) diluted in PBS1x, 1:100, overnight at 4°C. The LSAB2 System-HRP (DAKO, Denmark) was used according to the protocol of the manufacturer. Negative controls were performed by substituting the primary antibody with normal rabbit IgG (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA).

Statistical analysis

Western analysis of pregnant animals was repeated 3 to 4 times (3 to 4 different rats/endometrial extract per day). Endometrial extracts from each rat were assessed

individually. Results subjected to statistical analysis were expressed as mean \pm SEM. Data were subjected to one-way ANOVA and unpaired t test (PRISM software version 4.0; GraphPad; San Diego, CA). Differences between experimental groups were determined by the Tukey's test.

RESULTS

Expression of Akt-1, -2 and -3 in the pregnant and pseudopregnant rat endometrium

Since we have recently demonstrated the importance of Akt activity inhibition in TGF- β induced-apoptosis in rat decidual cells *in vitro* [5, 11], we sought to determine its expression and activity during pregnancy. We found that pAkt levels increased at day 5 of pregnancy and at day 3 of pseudopregnancy (Fig. 1). Furthermore, Akt phosphorylation was gradually reduced from days 12 to 22 of pregnancy but was further increased at day 1 postpartum (PP). Total Akt was increased at day 5 of pregnancy and pseudopregnancy, which may indicate a relation between hormonal surge and Akt regulation, and decreased from days 12 to 22 and was further increased at day 1 postpartum (PP). In order to pinpoint which Akt isoforms was upregulated during pregnancy, we have determined the expression level of the three Akt isoforms at the time of implantation (days 1 to 9), during pseudopregnancy (days 1 to 9) and late pregnancy (days 12 to 22 and day 1 PP). Results showed that Akt1 was increased at day 5 (Fig. 2). In pseudopregnancy, Akt1 decreased from day 3 to day 7. Akt2 increased from day 3 to day 9 during early pregnancy. In pseudopregnancy, Akt2 was increased at day 3, but it was not statistically significant. Akt3 did not show increased or decreased expression during early pregnancy or pseudopregnancy. Total Akt and all three Akt isoforms during late pregnancy showed a decrease from day 12 to 22 and peak at postpartum, suggesting a possible role for Akt at time of postpartum instead of an action in DB regression.

In vivo activation of Akt-1, -2 and -3 in endometrial cells

Specific protein activation is essential for efficient conceptus implantation. However, Akt3 was the only isoform phosphorylated at implantation day (day 5) and postpartum (PP) as demonstrated by immunoprecipitation (IP) (Fig. 3A,B), suggesting a specific role for Akt3 at implantation time and at day 1 postpartum. Moreover, the increased Akt3 is observed at day 5 as demonstrated by the ratio pAkt/Akt3 (Fig. 3C).

In vivo modulation of XIAP, Smac/DIABLO and PTEN in endometrium

To further investigate the regulation of factors that might be involved in cell survival, proteins known to regulate PI3-K/Akt pathway activity such as XIAP, Smac/DIABLO and PTEN were studied. Several studies have shown a possible link between XIAP expression and Akt activity [21-23]. We sought to determine XIAP expression in pregnant rat endometrium. XIAP expression was reduced from day 1 to 9 of pregnancy and pseudopregnancy (Fig. 4) then was increased at day 14 to further decrease until the end of pregnancy. Reduced XIAP expression from day 12 to 22 was concomitant to reduced pAkt expression on days 20-22 suggesting a possible functional link between XIAP expression and Akt activity. As stated previously, Smac/DIABLO is known to inhibit XIAP. During pregnancy, we observed a constant level of Smac/DIABLO, but in pseudopregnancy a gradual decrease was observed from day 1 to 9 (Fig. 4). This result suggests that the conceptus might have an impact on Smac/DIABLO expression. Finally, PTEN expression, a pro-apoptotic phosphatase negatively involved in Akt phosphorylation, was not influenced during early pregnancy but was reduced on days 14 to 22 (Fig. 4). In pseudopregnant rat, a peak of PTEN expression at day 5 was observed.

pI κ B expression is dependent of the presence of conceptus

We observed no significant difference of pI κ B protein during early pregnancy but expression on day 14 of pregnancy was significantly higher compared to other days of late pregnancy and post-partum (Fig. 5A). On the contrary, no pI κ B was detected during pseudopregnancy. A statistically constant rate of NF- κ B expression was observed during early pregnancy and was decreased from day 14 to day 22 of late pregnancy.

NF- κ B expression was significantly increased from day 1 to 3 and expression gradually decreased from day 3 to day 9 of pseudopregnancy. NF- κ B was significantly increased at day 1 postpartum (PP) compared to expression during late pregnancy (days 20-22). Immunohistochemistry was used to localize NF- κ B in the endometrial cells from pregnant and pseudopregnant rats. We noticed the presence of NF- κ B in the nucleus of pregnant but not in pseudopregnant rats (Fig. 5B).

Effect of PI3-K inhibition on pAkt and XIAP expression

To investigate the regulation of factors that might be involved in rat implantation through the PI3-K/Akt pathway, we used Wortmannin (1,4mg/kg), a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor [24]. It was injected *in vivo* to block Akt phosphorylation. As hypothesized, Wortmannin prevented Akt phosphorylation and reduced XIAP expression (Fig. 6). Apoptosis markers, caspase-3 and cleaved PARP, were measured during Akt inhibition. No significant change was observed in cleaved caspase-3 and cleaved PARP level (Fig. 6). A significant decrease in the phosphorylation of Smad2 was observed, suggesting a possible modulation of TGF- β signaling through an interaction with Akt in this system (Fig. 6). Only the secreted form of TGF- β 2 isoform was significantly decreased. This possibly shows that secretion of TGF- β 2 and the activation of Smad2 is PI3-K/Akt dependent. LY294002, another well known and characterized phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor [25], was used *in vitro* to block Akt phosphorylation in cultured decidual cells (Fig. 7A). *In vitro*, LY294002 prevented Akt phosphorylation and reduced XIAP expression in a dose-dependent manner (Fig. 7A), suggesting again that Akt activity may regulate XIAP expression in decidual cells, as observed in other systems [21, 22].

DISCUSSION

It is generally accepted that rodent pregnancy is punctuated by a progressive induction of apoptosis and cell survival through the maternal tissues lining the conceptus, but molecular mechanisms involved in triggering those process in endometrial cells are still

unknown. The aim of the present study was to characterize the expression of the PI3-K/Akt survival pathway actors in the rat uterus during pregnancy.

Our data demonstrate evidence for overlapping actions but not redundant roles for all three Akt isoforms. Each Akt isoform are expressed during both pseudopregnancy and pregnancy. Besides, only the Akt3 isoform was phosphorylated at the time of implantation and at the day 1 postpartum. The ratio of pAkt/Akt3 also shows that the phosphorylation was higher at day 5 during early pregnancy. Recent studies showed that the different isoforms have different functions. Akt1 has a critical role in cell survival: Akt1 null mice are smaller than their wild-type counterparts and Akt1 knockout cells display higher rates of apoptosis [26, 27]. Akt2 has a role in the maintenance of glucose homeostasis: Akt2 knockout mice develop a type 2 diabetes-like phenotype and cells derived from those mice show impaired glucose utilization [28, 29]. Akt3 knockout mice are viable and fertile but display impaired brain development [30]. Although these data strongly support the hypothesis that different cellular processes are primarily under the control of the different Akt isoforms, phenotypic analyses of double Akt isoform knockout mice revealed some functional redundancy among the three isoforms. Simultaneous deletion of Akt1 and Akt2 causes lethality shortly after birth [31]. Akt1/Akt3 double knockout mice are embryonic lethal [32] whereas mice with a single functional allele of Akt1 (Akt1^{+/-};Akt2^{-/-};Akt3^{-/-}) are viable despite reduced body weight and insulin and glucose intolerance. According to our data, these support the idea that each isoforms play a different role in different steps of the pregnancy [32] and during the recovery process involve after parturition. Also, these support the fact that the activation of one isoform could be dependent of the tissues or a specific stimulus [33].

The present results strengthen our hypothesis that the active form of Akt (phospho-Akt) is an important protein during cell survival events occurring in the endometrium during rat early and late pregnancy. At the time of implantation (day 5), Akt phosphorylation is increased and apoptosis is decreased demonstrated by the diminution of the cleaved caspase-3 fragment [5]. In the late phase of the pregnancy we observed the opposite, indeed at time of DB regression (day 14-16), Akt phosphorylation is reduced and is in

agreement with previous studies showing that apoptosis is increased in the endometrium during this period of pregnancy [5]. These results support the fact that this pathway is more active during embryo implantation and must be reduced at the time of DB regression which reinforces the idea that activity is related to cell survival and protection. Although at implantation, caspase-3 cleavage is not under the influence of Akt phosphorylation as demonstrated by Wortmannin inhibition. We have previously demonstrated increased Akt expression and activity in response to 17 β -estradiol in the cycling rat uterus and this might be an important mechanism to protect endometrial cells from apoptotic triggering and to induce endometrial cell proliferation [34]. However inhibition of Akt activity might lead to caspase-3 activation and apoptosis in a more cell-independent fashion, particularly at the level of epithelial endometrial cells. A similar process might be involved in the pregnant rat uterus. However, the presence of active cleaved caspase-3 does not necessarily indicate that apoptosis will be triggered since many caspase inhibitors can be present in the cytoplasm to block their activities. One example of such inhibitor is the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) [22]. Surprisingly, our results showed that XIAP expression was high at the beginning of DB regression (day 14 of pregnancy). Nonetheless, in the uterus of cycling rats, a similar situation was observed: apoptosis was strong at estrus even though XIAP expression was maximal [20]. We also showed that XIAP expression was high at day 1 and gradually decreased up to day 9. Since XIAP is an anti-apoptotic factor, logically its expression should be reduced at the time of apoptosis induction. It is therefore possible that XIAP be inhibited in pregnancy to allow apoptosis of only few specific cells which facilitate embryo attachment to the maternal endometrium and decidual regression. This inhibition of XIAP could be accomplished by Smac/DIABLO. To be translocated in the cytosol from the mitochondria, Smac/DIABLO need a stress [35]. When expression of Smac/DIABLO is compared between pregnancy and pseudopregnant rats, we propose that the conceptus could induce a constant release of Smac/DIABLO in the cytosol to inhibit XIAP in specific cell in the endometrium at the time of implantation. It has been showed in ovariectomized rats that XIAP expression was increased by 17 β -estradiol, which is consistent with the mitogenic activity of 17 β -estradiol and the apoptosis inhibitory activity of XIAP [20]. In the present study, XIAP expression positively

correlates with proliferative phases of pregnancy, supporting the fact that XIAP might act as an anti-apoptotic factor. However, cellular activities other than inhibition of caspases have recently been ascribed to XIAP. Notably, it has been demonstrated that XIAP functions as a cofactor for TGF- β 1 in the regulation of gene expression [36]. Also, we demonstrated that XIAP expression is regulated by the three isoforms of TGF- β in a Smad-dependent manner [23, 37]. We have previously shown that exposure to the three TGF- β isoforms decreases XIAP protein content and Akt phosphorylation in rat endometrial cells [5, 11]. Inhibition of Akt phosphorylation *in vivo* by Wortmannin or *in vitro* by LY294002 lead to a decreased expression of XIAP and a decrease in expression of TGF- β 2 *in vivo*. This indicates that Akt activity and TGF- β pathway may be involved in the regulation of XIAP expression in endometrial cells.

It is also possible that Akt regulates XIAP via NF- κ B in endometrial cells. Akt activity can induce NF- κ B mobilization and activation by I κ B phosphorylation [38-40], NF- κ B plays a significant role in immune regulation and may participate to the mechanism by which the fetus avoids maternal rejection throughout pregnancy. As the embryo implants, the uterus becomes aware of its presence and changes are made accordingly in order to maintain and feed the conceptus. Some intracellular signals are triggered by the embryo and some are coming from the maternal endometrium. The comparison between pregnant and pseudopregnant rats shows that the conceptus could regulate the phosphorylation of I κ B. We observed a constant amount of pI κ B proteins throughout early pregnancy. On the contrary, no pI κ B was detected during pseudopregnancy suggesting a role for the PI3-K/Akt pathway and NF- κ B at the onset of embryo implantation. Recent studies have shown that NF- κ B could be activated by the PI3-K/Akt pathway [17]. The presence of the embryo seems to activate NF- κ B by I κ B phosphorylation and therefore be associated with the activation of the maternal immune system. It is believed that maternal cells present in the endometrium play a key supportive role during implantation [41]. The sex steroid progesterone is crucial to build and maintain an endometrial lining into which the blastocyst can implant and grow. Progesterone has also an important immuno-suppressive effects [42] and it has been shown to increase I κ B expression [43] which could prevent the rejection of the fetus by

the maternal immune-system. Taken together, these data indicate that specific factors regulate expression of NF- κ B/I κ B in a pregnancy-specific manner, and may underlie one mechanism by which the fetus avoids maternal rejection throughout pregnancy. At post-partum, we observed an increase of Akt phosphorylation, PTEN protein content and NF- κ B expression. Moreover, previous reports indicate that the transcription factor NF- κ B can control the transcription of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2) gene through IKK pathway activation in different systems [12, 39]. Our results suggest that the PI3-K/Akt pathway might be involved during parturition through NF- κ B transcription factor; it was investigated by our laboratory that a subsequent Ptgs2 upregulation lead to prostaglandins production by endometrial cells [44]. Also, we proposed that increased Akt activation is important for the regeneration of the endometrium after the parturition.

PTEN, a phosphatase localized at the plasma membrane [45] which directly dephosphorylates the phospholipid PIP₃ and is important for Akt phosphorylation/activation [46], might, contrary to our hypothesis, not be the phosphatase involved in the regulation of Akt activity in implantation and DB regression since the level of PTEN protein was not influenced by pAkt levels. The current results clearly show that PTEN protein was present in the endometrium and was influenced by pregnancy. A study in the human endometrium revealed that PTEN might be regulated by progesterone throughout the human menstrual cycle [47]. We also demonstrate in a previous study that XIAP regulates PTEN protein content and localization [23]. XIAP is able to ubiquitin PTEN through its RING domain containing E3 ubiquitin ligase activity [48]. Content and compartmentalization of PTEN are affected by this modification and PTEN may not be available at the membrane level following its nuclear translocation through mono-ubiquitination by XIAP, and this may explain why PTEN expression is not observed during this process.

Recently, we have shown the expression of all three TGF- β isoforms in the pregnant rat uterus and confirmed the presence of apoptosis in epithelial cells during embryo implantation and during DB regression [5, 8]. In our latter study, the secreted form of

TGF- β 1 and - β 2 rose at days 5.5 to 6.5 but TGF- β 3 was not detected [8]. We also demonstrated that TGF- β 1, 2, 3 induced apoptosis, which suggest that they might be important regulators of cell fate during early pregnancy [5, 11]. TGF- β 1 and β 3 induced Smad2 phosphorylation [5, 11]. We showed that TGF- β 2 treatment decrease pAkt and pSmad2 [11]. The present study showed that, Wortmannin treatment induced a significant decrease of pSmad2 *in vivo*, indicating an Akt-dependent blockade of autocrine TGF- β signaling. The results also showed a significant decrease of TGF- β 2 with Wortmannin treatment. Therefore, these results suggest that phosphorylation of Smad2 is dependent of the activation of TGF- β 2 by Akt3 activation at the time of implantation in endometrial cells. It could be explained by recent studies showing that upon activation Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27^{Kip1} at threonine 157. This contributes to cytosolic retention of p27, thus relieving cyclin-dependent kinases (CDK)s from p27-induced inhibition and allowing Smad phosphorylation to induce its transcriptional action [49, 50]. A recent study also showed that Akt pathway can modulate the TGF- β signaling by a direct interaction with Smad3 [51]. Additionally, neither Wortmannin nor LY294002 are specific PI3-kinase inhibitors, Wortmannin inhibiting PI3 kinase as well as polo-like kinase 1 [52]. Nevertheless, all rats treated with Wortmannin have the normal number of implantation sites, showing an average of 11.3 sites/rat (data not shown). This indicates that Akt phosphorylation may not be absolutely required for the establishment of embryo implantation in the uterus. However, since activation of Akt was not completely inhibited by Wortmannin, it is possible that implantation need only a small amount of activated Akt or this suggests that another pathway could compensate for the down regulation of pAkt. It has been demonstrated that ERK and Akt could play cooperative roles, in maintenance signal for survival at an early stage of pregnancy establishment [53]. We thus propose a link between TGF- β and the PI-3K/Akt pathways at the time of embryo implantation.

CONCLUSION

Considering the sum of factors known to influence the probability of successful implantation, it is unlikely that the problem can be solved by addressing only one pathway. This study demonstrates that Akt activity is important to direct endometrial cell fate during pregnancy. We describe the modulation of the three Akt isoforms in rat endometrial cells in presence or absence of a conceptus and we showed that the PI3-K/Akt pathway and TGF- β might be connected and involved in the endometrium. All the information gained from the present study will enlighten the importance of apoptosis and cell survival in a successful reproductive process.

REFERENCES

1. Tabibzadeh S, Babaknia A. Molecular aspects of implantation: The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Human Reproduction* 1995; 10:1579-1602.
2. Parr EL, Tung H, Parr MB. Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biol Reprod* 1987; 36:211-225.
3. Pampfer S, Donnay I. Apoptosis at the time of embryo implantation in mouse and rat. *Cell Death Differ* 1999; 6:533.
4. Moulton B. Transforming growth factor-beta stimulates endometrial stromal apoptosis in vitro. *Endocrinology* 1994; 134:1055.
5. Shooner C, Caron PL, Fréchette-Frigon G, Leblanc V, Déry MC, Asselin E. TGF-beta expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3:20-22.
6. del Re E, Babitt JL, Pirani A, Schneyer AL, Lin HY. In the Absence of Type III Receptor, the Transforming Growth Factor (TGF)- β Type II-B Receptor Requires the Type I Receptor to Bind TGF- β 2. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279:22765-22772.
7. Qian SW, Dumont N, O'Connor-McCourt MD, Burmester JK. Distinct Functional Domains of TGF- β Bind Receptors on Endothelial Cells. *Growth Factors* 1999; 17:63-73.
8. Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF- β superfamily. *Science* 2002; 296:1646.
9. Itoh S, Itoh F, Goumans M-J, ten Dijke P. Signaling of transforming growth factor- β family members through Smad proteins. *European Journal of Biochemistry* 2000; 267:6954-6967.
10. Yoshida K, Matsuzaki K, Mori S, Tahashi Y, Yamagata H, Furukawa F, Seki T, Nishizawa M, Fujisawa J, Okazaki K. Transforming Growth Factor- β and Platelet-Derived Growth Factor Signal via c-Jun N-Terminal Kinase-Dependent Smad2/3 Phosphorylation in Rat Hepatic Stellate Cells after Acute Liver Injury. *The American Journal of Pathology* 2005; 166:1029-1039.
11. Caron PL, Fréchette-Frigon G, Shooner C, Leblanc V, Asselin E. Transforming growth factor beta isoforms regulation of Akt activity and XIAP levels in rat endometrium during estrous cycle, in a model of pseudopregnancy and in cultured decidual cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009; 7:80.

12. Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochemical Journal* 2000; 76:561.
13. Dan HC, Sun M, Kaneko S, Feldman RI, Nicosia SV, Wang H-G, Tsang BK, Cheng JQ. Akt Phosphorylation and Stabilization of X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP). *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279:5405-5412.
14. Goswami A, Burikhanov R, de Thonel A, Fujita N, Goswami M, Zhao Y, Eriksson JE, Tsuruo T, Rangnekar VM. Binding and Phosphorylation of Par-4 by Akt Is Essential for Cancer Cell Survival. *Molecular Cell* 2005; 20:33-44.
15. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281:1322.
16. Yang L, Sun M, Sun X-m, Cheng GZ, Nicosia SV, Cheng JQ. Akt Attenuation of the Serine Protease Activity of HtrA2/Omi through Phosphorylation of Serine 212. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282:10981-10987.
17. Wang Y, Chang J, Li Y-C, Li Y-S, Shyy JY-J, Chien S. Shear stress and VEGF activate IKK via the Flk-1/Cbl/Akt signaling pathway. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2004; 286:H685-H692.
18. Ackerman WE, Zhang XL, Rovin BH, Kniss DA. Modulation of Cytokine-Induced Cyclooxygenase 2 Expression by PPAR γ Ligands Through NF κ B Signal Disruption in Human WISH and Amnion Cells. *Biol Reprod* 2005; 73:527-535.
19. Honda Y, Tanikawa H, Fukuda J, Kawamura K, Sato N, Sato T, Shimizu Y, Kodama H, Tanaka T. Expression of Smac/DIABLO in mouse preimplantation embryos and its correlation to apoptosis and fragmentation. *Molecular Human Reproduction* 2004; 11:183.
20. Leblanc V, Dery MC, Shooner C, Asselin E. Opposite regulation of XIAP and Smac/DIABLO in the rat endometrium in response to 17 β -estradiol at estrus. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:59.
21. Asselin E, Wang Y, Tsang BK. X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein Activates the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway in Rat Granulosa Cells during Follicular Development. *Endocrinology* 2001; 142:2451-2457.
22. Asselin E, Mills GB, Tsang BK. XIAP Regulates Akt Activity and Caspase-3-dependent Cleavage during Cisplatin-induced Apoptosis in Human Ovarian Epithelial Cancer Cells. *Cancer Research* 2001; 61:1862-1868.

23. Van Themsche C, Leblanc V, Parent S, Asselin E. X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) Regulates PTEN Ubiquitination, Content, and Compartmentalization. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284:20462-20466.
24. Singh VP, Saluja AK, Bhagat L, van Acker GJD, Song AM, Soltoff SP, Cantley LC, Steer ML. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of trypsinogen modulates the severity of acute pancreatitis. *The Journal of Clinical Investigation* 2001; 108:1387-1395.
25. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269:5241-5248.
26. Chen WS, Xu P-Z, Gottlob K, Chen M-L, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Hay N. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the akt1 gene. *Genes & Development* 2001; 15:2203-2208.
27. Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ. Akt1/PKB α Is Required for Normal Growth but Dispensable for Maintenance of Glucose Homeostasis in Mice. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276:38349-38352.
28. Garofalo RS, Orena SJ, Rafidi K, Torchia AJ, Stock JL, Hildebrandt AL, Coskran T, Black SC, Brees DJ, Wicks JR, McNeish JD, Coleman KG. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB β . *The Journal of Clinical Investigation* 2003; 112:197-208.
29. Tschopp O, Yang Z-Z, Brodbeck D, Dümmler BA, Hemmings-Mieszczak M, Watanabe T, Michaelis T, Frahm J, Hemmings BA. Essential role of protein kinase B γ (PKB γ /Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* 2005; 132:2943-2954.
30. Peng X-d, Xu P-Z, Chen M-L, Hahn-Windgassen A, Skeen J, Jacobs J, Sundararajan D, Chen WS, Crawford SE, Coleman KG, Hay N. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes & Development* 2003; 17:1352-1365.
31. Yang Z-Z, Tschopp O, Di-Poï N, Bruder E, Baudry A, Dümmler B, Wahli W, Hemmings BA. Dosage-Dependent Effects of Akt1/Protein Kinase B α (PKB α) and Akt3/PKB γ on Thymus, Skin, and Cardiovascular and Nervous System Development in Mice. *Molecular and Cellular Biology* 2005; 25:10407-10418.

32. Dummler B, Tschopp O, Hynx D, Yang Z-Z, Dirnhofer S, Hemmings BA. Life with a Single Isoform of Akt: Mice Lacking Akt2 and Akt3 Are Viable but Display Impaired Glucose Homeostasis and Growth Deficiencies. *Molecular and Cellular Biology* 2006; 26:8042-8051.
33. Gonzalez E, McGraw TE. The Akt kinases: Isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* 2009; 8:2502-2508.
34. Dery MC, Leblanc V, Shooner C, Asselin E. Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17 β -estradiol in the rat uterus during estrous cycle. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2003; 1:47.
35. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. *Cell* 2000; 102:33-42.
36. Reffey SB, Wurthner JU, Parks WT, Roberts AB, Duckett CS. X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein Functions as a Cofactor in Transforming Growth Factor- β Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276:26542-26549.
37. Van Themsche C, Chaudhry P, Leblanc V, Parent S, Asselin E. XIAP gene expression and function is regulated by autocrine and paracrine TGF-beta signaling. *Molecular Cancer* 2010; 9:216.
38. Béraud C, Henzel WJ, Baeuerle PA. Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF- κ B activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999; 96:429.
39. St-Germain ME, Gagnon V, Parent S, Asselin E. Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF- κ B/I κ B pathway. *Molecular Cancer* 2004; 3:7.
40. Gagnon V, St-Germain ME, Parent S, Asselin E. Akt activity in endometrial cancer cells: regulation of cell survival through cIAP-1. *International journal of oncology* 2003; 23:803.
41. King AE, Critchley HOD, Kelly RW. The NF- κ B pathway in human endometrium and first trimester decidua. *Molecular Human Reproduction* 2001; 7:175-183.
42. Kelly RW. Pregnancy Maintenance and Parturition: The Role of Prostaglandin in Manipulating the Immune and Inflammatory Response. *Endocrine Reviews* 1994; 15:684-706.

43. Wissink S, van Heerde EC, van der Burg B, van der Saag PT. A Dual Mechanism Mediates Repression of NF- κ B Activity by Glucocorticoids. *Molecular Endocrinology* 1998; 12:355-363.
44. St-Louis I, Singh M, Brasseur K, Leblanc V, Parent S, Asselin E. Expression of COX-1 and COX-2 in the endometrium of cyclic, pregnant and in a model of pseudopregnant rats and their regulation by sex steroids. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2010; 8:103.
45. Stambolic V, Tsao MS, Macpherson D, Suzuki A, Chapman WB, Mak TW. High incidence of breast and endometrial neoplasia resembling human Cowden syndrome in pten $^{+/-}$ mice. *Cancer Res* 2000; 60:3605.
46. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273:13375.
47. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Eng C. Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000; 85:2334.
48. Yang Y FS, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in responses to apoptotic stimuli. *Science* 2000; 288:874-877.
49. Kayisli UA, Guzeloglu-Kayisli O, Arici A. Endocrine-Immune Interactions in Human Endometrium. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004; 1034:50-63.
50. Alarcón C, Zaromytidou A-I, Xi Q, Gao S, Yu J, Fujisawa S, Barlas A, Miller AN, Manova-Todorova K, Macias MJ, Sapkota G, Pan D, et al. Nuclear CDKs Drive Smad Transcriptional Activation and Turnover in BMP and TGF- β Pathways. *Cell* 2009; 139:757-769.
51. Remy I, Montmarquette A, Michnick SW. PKB/Akt modulates TGF-[beta] signalling through a direct interaction with Smad3. *Nat Cell Biol* 2004; 6:358-365.
52. Liu Y, Shreder KR, Gai W, Corral S, Ferris DK, Rosenblum JS. Wortmannin, a Widely Used Phosphoinositide 3-Kinase Inhibitor, also Potently Inhibits Mammalian Polo-like Kinase. *Chemistry & Biology* 2005; 12:99-107.
53. Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Wu G. Comparative aspects of implantation. *Reproduction* 2009; 138:195.

FIGURES LEGENDS

Figure 1: Akt and pAkt expression in the rat endometrium during pregnancy and pseudopregnancy. Total endometrial proteins were collected at different days of pregnancy and pseudopregnancy. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis. Data represent the mean \pm SEM of four independent experiments. Different letters represent significantly different means ($P < 0,05$).

Figure 2: Akt1-1, -2 and -3 expression in the rat endometrium during pregnancy and pseudopregnancy. Total endometrial proteins were collected at different days of pregnancy and pseudopregnancy. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments. Different letters represent significantly different means ($P < 0,05$).

Figure 3: Immunoprecipitation of each isoform and western blot of pAkt. Total endometrial proteins were collected **A)** at day 5 of pregnancy and **B)** at the time of parturition. **C)** Ratio pAkt/Akt3 expression in the rat endometrium during pregnancy. Total endometrial proteins were collected at different days of pregnancy. Graphics represent Western blot densitometrical analysis. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments. Different letters represent significantly different means ($P < 0,05$).

Figure 4: XIAP, smac/DIABLO and PTEN expression in the rat endometrium during pregnancy and pseudopregnancy. Total endometrial proteins were collected at different days of pregnancy and pseudopregnancy. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis. Data represent the mean \pm SEM of three

independent experiments. Different letters represent significantly different means ($P < 0,05$).

Figure 5: A) pI κ B and NF κ B expression in the rat endometrium during pregnancy and pseudopregnancy. Total endometrial proteins were collected at different days of pregnancy and pseudopregnancy. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments. Different letters represent significantly different means ($P < 0,05$). **B)** Immunocytochemistry of NF κ B in the rat endometrium at the day 5 of pregnancy and pseudopregnancy. Tissues were collected at the day 5 of pregnancy and pseudopregnancy. IgG were used as control.

Figure 6: Effect of PI 3-K inhibitor wortmannin at the day 5 of the pregnancy on pAkt, XIAP, PTEN and pI κ B expression. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis and are the mean \pm SEM of independent experiments (three control and five treatments). Different letters represent significantly different means ($P < 0,05$).

Figure 7: Effect of PI3-K inhibitor LY294002 for 24h on Akt, pAkt and XIAP expression in cultured rat decidual cells. β -actin blots shown were used as controls to correct for loading. Blots shown are from one representative experiment. Graphics represent Western blot densitometrical analysis. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments. Different letters represent significantly different means ($P < 0,05$).

Figure 1

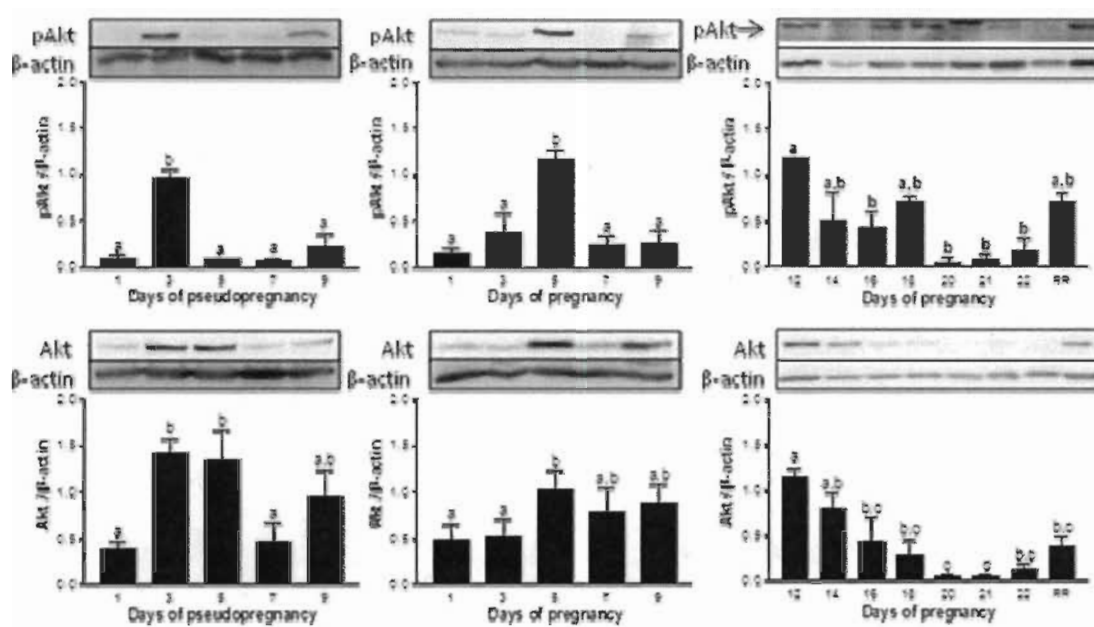


Figure 2

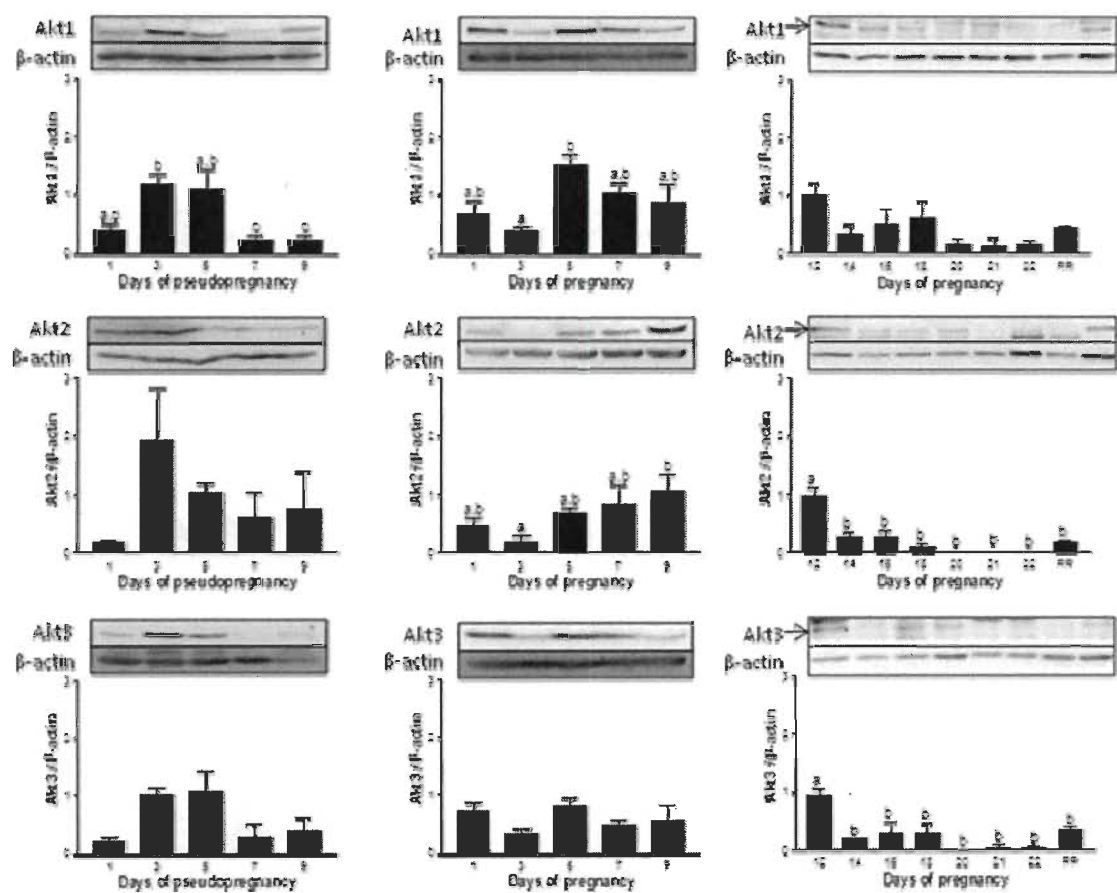


Figure 3

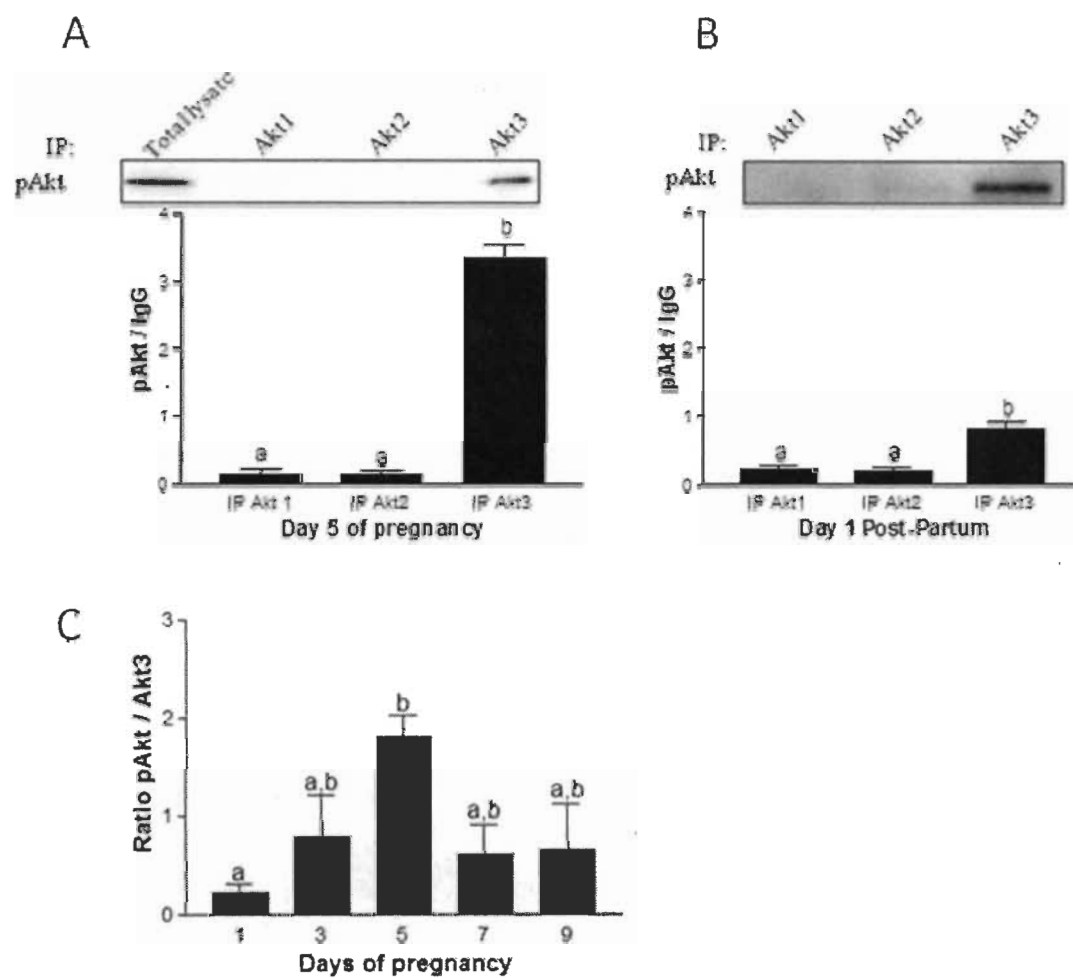


Figure 4

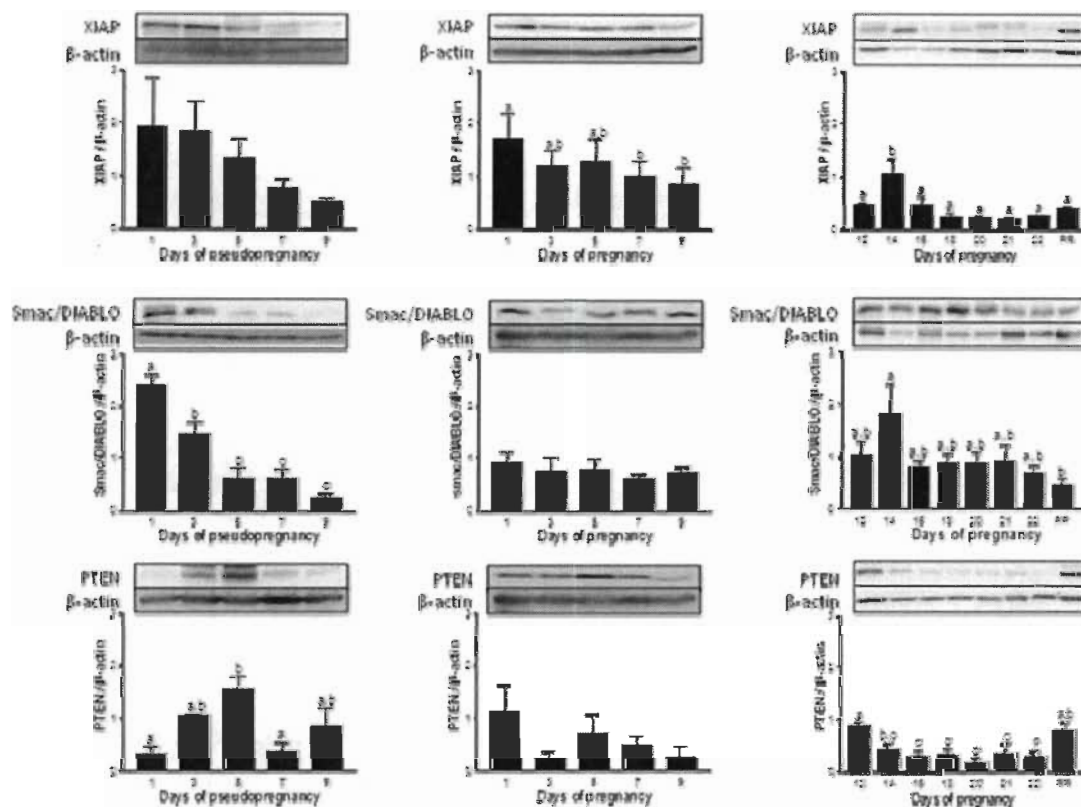


Figure 5

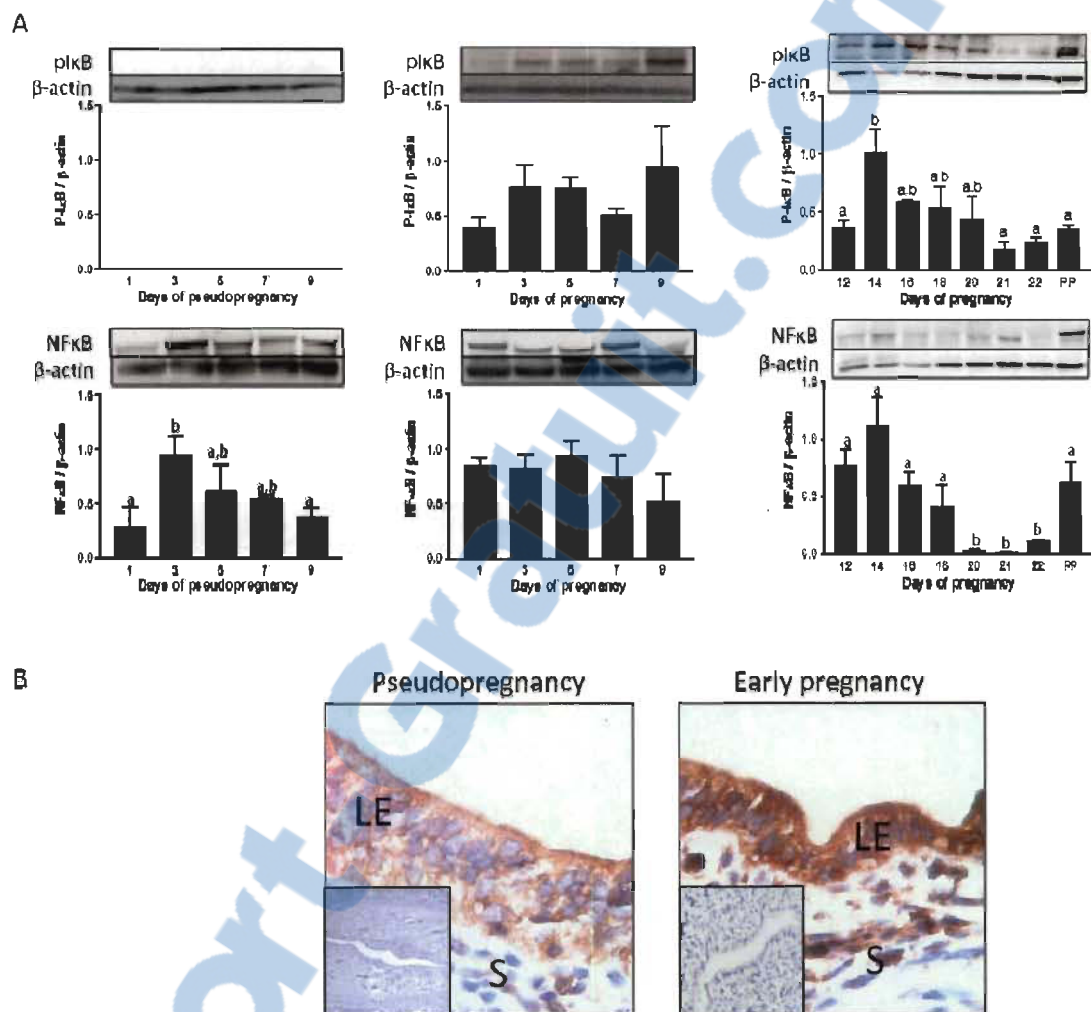


Figure 6

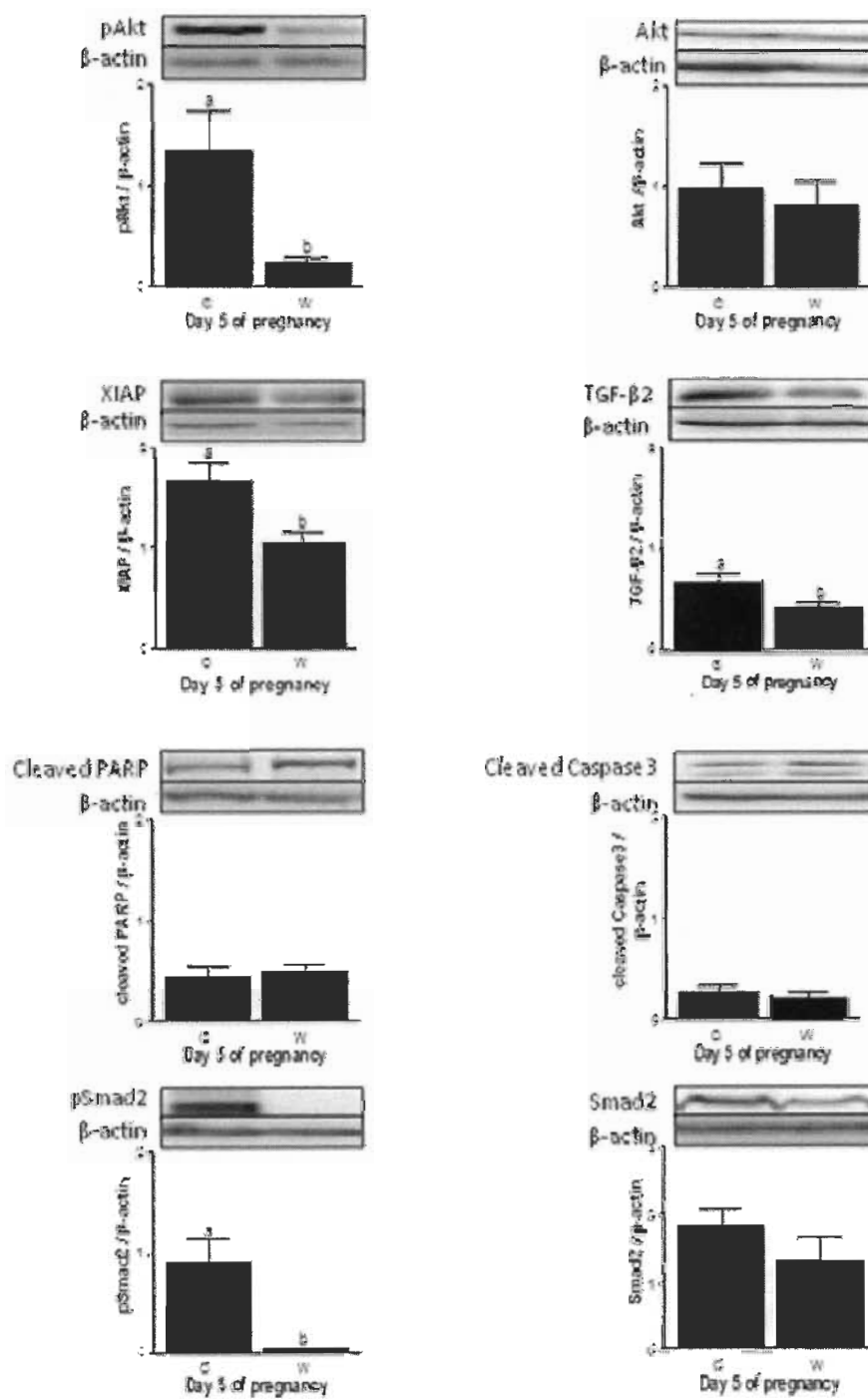
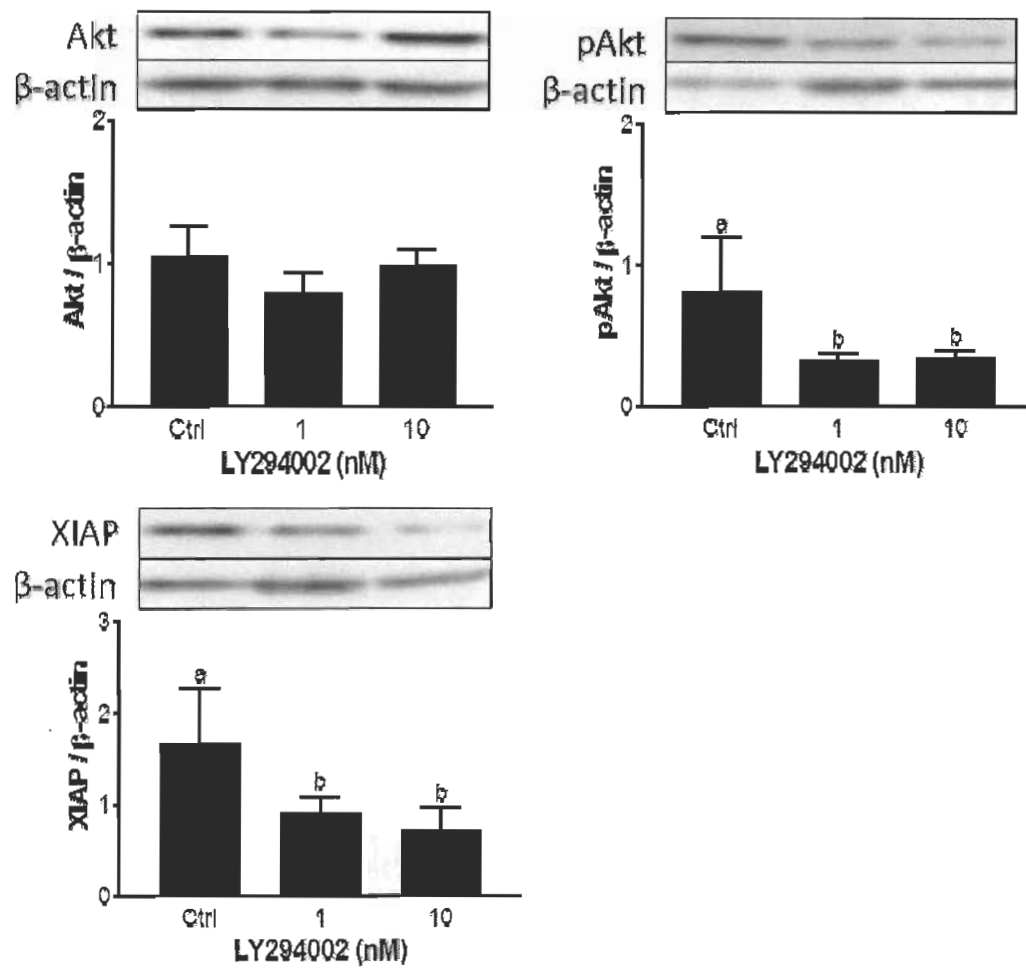


Figure 7



CHAPITRE III

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La gestation implique une communication protéique complexe entre l'endomètre de la mère et l'embryon. Il est généralement admis que la gestation chez les rongeurs est affectée par une induction ponctuelle d'apoptose (mort cellulaire programmée) et de survie cellulaire dans l'endomètre utérin entourant le *conceptus*. Les deux sont présentes lors de l'implantation embryonnaire afin de faciliter l'attachement de l'embryon à l'endomètre maternel. On sait que le stimulus initial qui permet une bonne implantation est dicté entre l'embryon lui-même et l'endomètre. Également, la régression déciduale, qui est caractérisée par l'apoptose, permet au *conceptus* de se développer et d'évoluer dans le milieu adéquat. Par contre, les mécanismes moléculaires impliqués dans le déclenchement de ces processus, dans les cellules endométriales, sont encore mal compris. La voie PI3-K/Akt est une voie signalétique qui contrôle la balance entre l'apoptose et la survie cellulaire. Lorsque la kinase Akt (trois isoformes connus) est phosphorylée, celle-ci active d'autres protéines qui vont bloquer l'apoptose et favoriser la prolifération cellulaire. Sans cette activation, l'inhibition de protéines pro-apoptotique est réduite, déclenchant ainsi l'apoptose [36].

L'hypothèse qui a dirigé cette étude est que la voie de signalisation PI3-K/Akt et les isoformes d'Akt, en interaction avec la voie des TGF- β , jouent un rôle majeur dans la régulation entre l'apoptose et la survie cellulaire dans l'endomètre utérin de la ratte durant la gestation.

Afin de permettre l'implantation, le blastocyste libère certains facteurs embryonnaires, comme le TGF- β . Le TGF- β est une cytokine qui régule la prolifération, la différenciation et l'invasion. Les isoformes du TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3) activent leurs récepteurs et permet ainsi la transcription qui mènera à l'apoptose.

Afin de mieux comprendre les mécanismes protéiques impliqués dans la gestation, la ratte a été le modèle animal utilisé. La gestation de ce rongeur est sensiblement affectée de la même façon par l'œstrogène et la progestérone que chez la femme. Le court cycle œstral et la durée de gestation de 22 jours ont permis d'apprendre rapidement comment les protéines de la voie PI3-K/Akt évoluaient dans l'endomètre. Également, les échantillons d'endomètre utérin récoltés aux deux jours de la gestation étaient suffisamment volumineux pour effectuer diverses analyses. La pseudogestation a été réalisée à l'aide de mâles vasectomisés. Celle-ci est caractérisée par le même changement hormonal, mais l'endomètre n'est pas affecté par un embryon. La comparaison avec la gestation a donc permis de voir l'impact du *conceptus* sur les cellules endométriales.

Nos données montrent que l'expression protéique de chaque isoforme d'Akt est constante tout le long de la pseudogestation. Tous sont exprimés en début de gestation, avec une légère augmentation au jour 5, en comparaison avec le jour 3. Entre les jours 12 et 22, une diminution du niveau d'expression d'Akt2 et Akt3 a été observée. Ces résultats sont en accord avec d'autres études (présentées plus bas) qui démontrent que les trois isoformes ont sensiblement les mêmes modes d'action, mais que chacun possède un rôle défini dans un contexte particulier. Akt1 aurait un rôle crucial dans la survie cellulaire. Des souris mutantes Akt1 présentent une taille plus petite que les souris sauvages [44]. Le taux d'apoptose est également plus élevé chez les souris mutantes [44, 45]. L'isoforme Akt2 aurait davantage un rôle dans le maintien de l'homéostasie du glucose [46]. La mutation de l'isoforme Akt2 chez des souris a entraîné un développement d'un diabète de type 2 comme phénotype. Également, leurs cellules utilisaient difficilement le glucose [46, 47]. Des souris mutantes Akt3 sont pour leur part des souris viables et fertiles. Cependant, elles affichent un retard de développement au niveau du cerveau [48]. Une étude récente a démontré que la double mutation Akt1/Akt3 est létale au stade embryonnaire chez la souris [31]. Aussi, une suppression d'Akt1 et d'Akt2 a entraîné la mort des nouveaux nés peu de temps après la naissance [49]. Par contre, un seul allèle fonctionnel d'Akt1 permet à ces souris d'être viables. Celles-ci présentent par contre un poids corporel réduit et une intolérance à l'insuline et au

glucose [31]. Ces données appuient fortement l'hypothèse que les différents processus cellulaires sont sous le contrôle des différents isoformes d'Akt. Nos résultats soutiennent également l'idée que chaque isoforme pourrait jouer un rôle différent dans chacune des étapes de la grossesse et pendant le processus de récupération après l'accouchement.

Les présents résultats renforcent notre hypothèse selon laquelle Akt, lorsqu'elle est activée (pAkt), est une protéine importante pour la survie cellulaire de l'endomètre de ratte gestante. Au jour 5 et au jour 1 *post-partum*, pAkt montre une augmentation. L'immunoprécipitation de chaque isoforme, suivi d'un immunobuvardage de type western, a permis de révéler que seul l'isoforme Akt3 est phosphorylé à ces deux périodes de la gestation. Comme l'implantation est au jour 5 de la gestation, il est proposé que l'isoforme Akt3 joue, à cette étape, un rôle de protection dans les cellules endométriales de l'utérus. Après la parturition, l'utérus doit revenir à un état normal. La prolifération cellulaire est de mise pour reconstruire la paroi interne de l'utérus. Akt3 serait donc l'isoforme responsable de cette régénération cellulaire. Des résultats antérieurs à la présente étude ont montré qu'au moment de l'implantation, le taux de pAkt est augmenté et le taux de caspase-3 clivée est diminué [1]. L'apoptose est donc diminuée également. À ce stade, la caspase-3 n'est pas sous l'influence de l'activation de l'isoforme Akt3, ici démontré lors de l'inhibition par la wortmannin. Dans la phase tardive de la grossesse, on observe l'effet contraire. Au moment de la régression déciduale, pAkt diminue et la caspase-3 clivée augmente [1]. L'apoptose est ainsi augmentée. Des traitements au 17 β -estradiol chez des rattes avec une ovariectomie ont augmenté l'expression et l'activation de la kinase Akt. Ceci est un mécanisme important afin de protéger les cellules de l'endomètre d'un déclenchement inapproprié du phénomène d'apoptose [50]. L'augmentation de la phosphorylation d'Akt pourrait être un mécanisme similaire impliqué dans l'utérus de la ratte en gestation.

La présence de caspase-3 clivée n'indique pas nécessairement que l'apoptose est déclenchée. Il existe plusieurs inhibiteurs de caspases dans le cytoplasme qui ont pour but de bloquer l'action de celles-ci. Un exemple d'un tel inhibiteur est le *X-linked inhibitor of apoptosis* (XIAP) [51]. Les résultats de la présente étude ont montré que

l'expression de XIAP est élevée au jour 1 et qu'elle diminue progressivement jusqu'au jour 9. Également, nos résultats ont montré une augmentation de l'expression de XIAP au début de la régression déciduale (jour 14). Une situation similaire est observée dans l'utérus de ratte dans le cycle œstral. Ces rattes présentaient de l'apoptose en oestrus et un taux d'expression de XIAP élevé [39]. Étant un facteur anti-apoptotique, son expression devrait être réduite au moment d'induction d'apoptose. L'inhibition de XIAP par un facteur pro-apoptotique dans des cellules spécifiques est toutefois plausible afin de permettre l'apoptose. Smac/DIABLO pourrait être ce facteur pro-apoptotique qui bloquerait XIAP dans les cellules endométriales de ratte en gestation. Smac/DIABLO est conservé dans la mitochondrie. La cellule doit subir un stress afin de relâcher cette protéine dans le cytosol [52]. Si l'on compare l'expression de Smac/DIABLO durant la gestation et la pseudogestation, il est proposé que les *conceptus* induisent un relâchement constant de Smac/DIABLO dans le cytosol afin d'inhiber XIAP. L'expression de XIAP corrèle avec la prolifération cellulaire et ses propriétés anti-apoptotique. Par contre, d'autres activités cellulaires ont été attribuées à XIAP. Il a été démontré que XIAP peut avoir une fonction de cofacteur au TGF- β dans la régulation de l'expression génique [53]. Également, l'expression de XIAP est régie par les trois isoformes de TGF- β par l'entremise des Smads [2]. Des traitements au TGF- β ont engendré une diminution du taux de XIAP et une baisse de phosphorylation d'Akt dans des cellules endométriales de ratte [1, 9]. Des études antérieures ont démontré que XIAP peut agir comme ubiquitine ligase E3 pour PTEN [38]. Lors de nos traitements à la wortmannin et au LY294002, l'inhibition d'Akt a entraîné une diminution de l'expression de XIAP. Ces résultats supportent l'idée que l'activation d'Akt dans les cellules endométriales de ratte en gestation a un impact sur l'expression de XIAP. Il est donc possible qu'Akt régule l'expression de XIAP avec l'aide d'un facteur nucléaire, tel le *Nuclear Factor- κ B* (NF- κ B).

NF κ B joue un rôle important dans la régulation du système immunitaire et il peut participer au mécanisme par lequel le fœtus évite le rejet maternel. Des études récentes ont montré que NF κ B pouvait être activé par la voie de signalisation PI3-K/Akt [54]. L'activité d'Akt peut induire la mobilisation et l'activation de NF κ B par la

phosphorylation d'I κ B [55-57]. L'utérus qui perçoit les signaux de l'embryon va apporter divers changements afin de maintenir et de nourrir le *conceptus*. Certains signaux extracellulaires peuvent provenir du *conceptus* ou de l'endomètre lui-même. Lorsque l'on compare la gestation et la pseudogestation, on peut en déduire que le fœtus a un impact sur la phosphorylation d'I κ B. Dans la gestation, un taux constant de pI κ B est observé. Par contre, lors de la pseudogestation, aucune phosphorylation d'I κ B n'est présente. NF κ B ne peut pas migrer au noyau, tel que démontré avec l'immunochimie réalisée sur les tissus utérins. La présence d'embryon semble activer NF κ B en phosphorylant I κ B. L'embryon active donc le système immunitaire maternel. Les cellules du système immunitaire présentes dans l'endomètre ont donc un grand impact dans le soutien de l'implantation [43]. La progestérone est également nécessaire afin d'établir et de maintenir l'épaississement de l'utérus dans lequel le blastocyste s'implante. Cette hormone stéroïdienne est également connue pour avoir un effet immunosuppresseur [58]. Celle-ci augmenterait la synthèse de I κ B [59], ce qui empêcherait le rejet du fœtus par le système immunitaire de la mère. En somme, ces données indiquent que des facteurs spécifiques régulent l'activation de NF κ B par un mécanisme typique à la gestation. Ainsi, le fœtus évite le rejet maternel. À la fin de la gestation de notre modèle, il est possible d'observer une augmentation d'expression de NF κ B. Nos résultats suggèrent également que la voie PI3-K/Akt pourrait être impliquée dans la parturition par le facteur de transcription NF κ B. Des études antérieures ont démontré que NF κ B est capable de contrôler la transcription de la cyclooxygénase-2 (COX-2) dans différents systèmes [30, 56]. Il a été démontré qu'une légère augmentation de COX-2 augmente la production de prostaglandine par les cellules endométriales [8]. Également, l'augmentation de pAkt pourrait avoir un impact sur la régénération de l'endomètre après la parturition.

Une augmentation d'expression de PTEN est observée à la fin de la gestation. PTEN est une phosphatase localisée à la membrane plasmique qui déphosphoryle directement le PIP3 en PIP2 [60]. Le PIP3 est important pour la phosphorylation d'Akt. Contrairement à notre hypothèse, cette phosphatase ne semble pas être impliquée dans la régulation de l'activité d'Akt durant l'implantation et la régression déciduale. Les

résultats de la présente étude montrent que la protéine PTEN est présente dans l'endomètre et que celle-ci est influencée par les hormones en début de gestation. Une étude dans l'endomètre humain a révélé que PTEN pourrait être régulée par la progestérone tout le long du cycle menstruel chez l'humain [61]. Il est démontré également que XIAP régule PTEN. En effet, XIAP contrôle la compartimentalisation et le contenu cellulaire de PTEN. Le PIP3 ne peut plus se faire déphosphoryler et cela engendre une activation d'Akt [38]. L'inhibition par la wortmaninn au jour 5 de la gestation a inhibé l'activation d'Akt3 (seul isoforme phosphorylé) et a diminué l'expression de XIAP, mais pas celle de PTEN. Il est donc possible que l'activation indirecte de PTEN puisse être spécifique à un isoforme d'Akt, soit Akt1 ou Akt2.

Il a été démontré que les trois isoformes de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3) dans l'utérus de ratte gestante et que le phénomène d'apoptose dans les cellules épithéliales de l'endomètre étaient présents au moment de l'implantation et de la régression déciduale [1, 62]. Dans une étude réalisée dans le laboratoire de recherche du Dr. Asselin, il a été observé que les formes sécrétées de TGF- β 1 et TGF- β 2 augmentent au jour 5,5 et au jour 6,5 [1]. Pour sa part, l'isoforme TGF- β 3 n'a pas été détecté. Cependant, il a été démontré que les trois isoformes induisent l'apoptose. Ces résultats suggèrent que les TGF- β pourraient être d'importants régulateurs dans le destin cellulaire au cours de la gestation [1]. Une autre étude au sein de ce même laboratoire a permis de démontrer que le TGF- β 1 et le TGF- β 3 induisent la phosphorylation de Smad2, contrairement à TGF- β 2 qui la diminue [9]. Le traitement de wortmaninn effectué au moment de l'implantation a causé une diminution significative de la phosphorylation de Smad2. Ces mêmes traitements montrent également une diminution significative de la forme active de l'isoforme TGF- β 2. Ces résultats suggèrent donc que la phosphorylation de Smad2 est dépendante de l'activation de l'isoforme Akt3 au moment de l'implantation embryonnaire. Cela pourrait être expliqué par des résultats récents qui démontrent que l'activation d'Akt engendre la progression de la division cellulaire par une phosphorylation de p27^{Kip1} au niveau de la thréonine 157. Cette phosphorylation enlève l'inhibition que le p27^{Kip1} exerce sur les *Cyclin-Dependent-Kinase* (CDK). Celle-ci peut par la suite permettre la prolifération cellulaire en activant

la transcription par la phosphorylation de Smad2 [41, 63]. Une autre étude a démontré qu'Akt peut moduler la signalisation de TGF- β par une interaction directe avec Smad3 [64]. Par ces résultats, il est plausible qu'un autre lien entre la voie de signalisation PI3-K/Akt et la voie des TGF- β (impliquant Smad2) soit présent au moment de l'implantation. Il est possible que la wortmannin ait affecté les embryons en modifiant la sécrétion de TGF- β 2 de ceux-ci. Ceci pourrait être causé par la diminution de pAkt dans les cellules endométriales. Cette diminution empêche une trop grande quantité de cellules d'entrer en apoptose.

En résumé, la communication proposée entre les cellules endométriales et celles du *conceptus* est que l'embryon sécrète certains facteurs afin que les cellules endométriales entrent en apoptose. Ceux-ci agiraient sur la voie de signalisation PI3K/Akt au niveau d'Akt et sur la voie des TGF- β au niveau de Smad2. La diminution de pAkt aurait un impact sur l'activation de NF κ B et sur l'expression de XIAP. L'apoptose et la survie cellulaire des cellules endométriale seraient ainsi régulées.

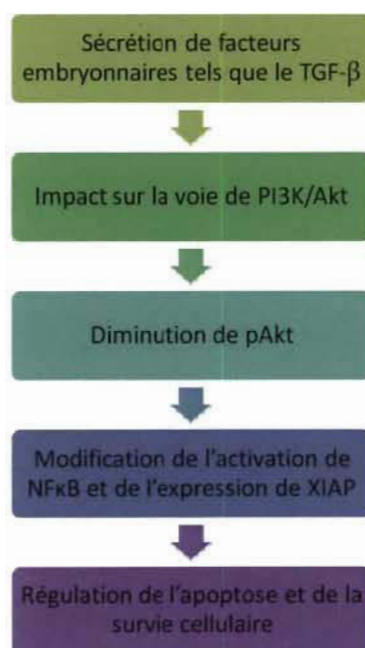


Figure 3.1 Schéma récapitulatif du mécanisme protéique impliqué entre l'embryon et l'endomètre lors de la gestation.

Par ailleurs, ni la wortmannin, ni le LY294002, n'inhibent totalement la PI3-K. De plus, la wortmannin inhibe d'autres polo-like kinases (PLK, protéine impliquée dans la régulation de différentes étapes du cycle cellulaire) [65]. Par contre, l'inhibition *in vivo* a permis d'observer un nombre normal de sites d'implantation, soit une moyenne de 11,3 sites/ratte. Ceci indique que l'activation d'Akt n'est pas totalement nécessaire à l'implantation embryonnaire dans l'endomètre de ratte. Il est possible qu'une autre voie puisse compenser la régulation à la baisse de la voie PI3-K/Akt. Il a été démontré que les voies d'ERK et d'Akt pourraient collaborer au maintien et la mise en place des différents stades précoces de la grossesse [14].

En somme, il existe plusieurs facteurs qui peuvent influencer la réussite de l'implantation. Cette étude a démontré que l'activité d'Akt est importante pour le destin des cellules endométriales durant la grossesse. Également, la modulation des trois isoformes d'Akt a été étudiée lors de la gestation et de la pseudogestation. Il a été observé que seul l'isoforme Akt3 est activé au moment de l'implantation et lors de la parturition. Ceci prouve que les isoformes ont des activités spécifiques à certaines étapes de la gestation. La voie PI3-K/Akt pourrait être impliquée dans l'implantation et après la parturition chez la ratte par l'entremise de la voie de TGF- β .

La comparaison entre la gestation et la pseudogestation a permis de voir que le *conceptus* a un impact sur l'activation d'Akt, sur la phosphorylation de pI κ B (donc sur l'activation de NF κ B) et sur le relâchement de Smac/DIABLO. L'inhibition de la PI3K par la wortmannin propose un lien entre la voie des TGF- β et la voie d'Akt par l'entremise de Smad2. L'expression de XIAP dans l'endomètre de la ratte au moment de l'implantation est dépendante de l'activation d'Akt, tel que démontré lors de l'inhibition par la wortmannin et le LY294002. L'inhibition de la PI3K par la wortmannin n'a pas diminué le nombre de sites d'implantations, ce qui propose que d'autres voies interagissent pour permettre une bonne implantation embryonnaire. Toutes les informations acquises lors de cette étude permettent d'éclaircir l'importance de l'apoptose et de la survie cellulaire dans les processus de reproduction. Également, ces données serviront à mieux documenter les voies de signalisation et les acteurs cellulaires qui contrôlent les mécanismes des étapes clés de la gestation.

Afin de valider que l'isoforme Akt3 est important au moment de l'implantation et après la parturition, l'utilisation de ratte K.O. d'Akt3 serait de mise. Aussi, des immunoprécipitations de chaque isoforme dans des cellules déciduales en culture permettraient de voir quel isoforme est activé. Afin de permettre une meilleure caractérisation moléculaire lors de traitement au LY294002, des immunobuvardages de type western devront être faits pour les protéines PTEN, Smac/DIABLO et I κ B/pI κ B/NF κ B. Également, une confirmation supplémentaire à l'aide d'une autre technique pour vérifier la translocation de NF κ B au noyau seulement chez les rattes gestantes pourrait être réalisée. Enfin, dans l'idée de transposer les résultats de la présente étude à l'humain, il serait de mise d'effectuer des analyses sur des endomètres de femme.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Shooner C, Caron PL, Fréchette-Frigon G, Leblanc V, Déry MC, Asselin E: **TGF-beta expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival.** *Reprod Biol Endocrinol* 2005, **3**:20-22.
2. Van Themsche C, Chaudhry P, Leblanc V, Parent S, Asselin E: **XIAP gene expression and function is regulated by autocrine and paracrine TGF-beta signaling.** *Molecular Cancer* 2010, **9**:216.
3. **Plan stratégique de 2011-2013 du conseil d'administration de PAC** [www.ahrc-pac.gc.ca]
4. Levasseur CTM-C : *La reproduction chez les mammifères et l'homme.* Nouvelle édition entièrement refondue edn., Edition Quae, Paris; 2001.
5. Johnson MH, Everitt BJ: *Reproduction.* 5e édition edn: De Boeck Université; 2001.
6. **Régulation hormonale de la fonction de reproduction chez la femme : schéma bilan en trois étapes** [http://svt.ac-dijon.fr/schemassvt/article.php3?id_article=733]
7. Flecknell HBWPA: *Experimental and Surgical Technique in the Rat.* second edition edn: Academic Press; 1992.
8. St-Louis I, Singh M, Brasseur K, Leblanc V, Parent S, Asselin E: **Expression of COX-1 and COX-2 in the endometrium of cyclic, pregnant and in a model of pseudopregnant rats and their regulation by sex steroids.** *Reproductive Biology and Endocrinology* 2010, **8**:103.
9. Caron PL, Fréchette-Frigon G, Shooner C, Leblanc V, Asselin E: **Transforming growth factor beta isoforms regulation of Akt activity and XIAP levels in rat endometrium during estrous cycle, in a model of pseudopregnancy and in cultured decidual cells.** *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009, **7**:80.
10. Lim HJ, Wang H: **Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models.** *The Journal of Clinical Investigation* 2010, **120**:1004-1015.
11. Abrahamsohn PA, Zorn TMT: **Implantation and decidualization in rodents.** *Journal of Experimental Zoology* 1993, **266**:603-628.

12. Parr EL, Tung H, Parr MB: **Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats.** *Biol Reprod* 1987, **36**:211-225.
13. d'Hauterive SP, Tsampalas M, Foidart J-M, Geenen V: **Y a-t-il un marqueur décisif de l'implantation embryonnaire?** *Revue mt médecine de la reproduction* 2007, **9**:389-398.
14. Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Wu G: **Comparative aspects of implantation.** *Reproduction* 2009, **138**:195.
15. Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA: **Interferons and Uterine Receptivity.** *Semin Reprod Med* 2009, **27**:090,102.
16. Heffner LJ: *Reproduction humaine.*, Sciences médicales, De Boeck, 2003, p53.
17. Yin X-M, Dong Z: *Essentials of Apoptosis; A Guide for Basic and Clinical Research.* Humana Press; 2003.
18. Joswig A, Gabriel H-D, Kibschull M, Winterhager E: **Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways.** *Reproductive Biology and Endocrinology* 2003, **1**:44.
19. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ: **BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis.** *Genes & Development* 1999, **13**:1899-1911.
20. **Apoptose : cascade de réactions impliquées dans le déclenchement de l'apoptose. Il existe deux voies principales du déclenchement de l'apoptose** [http://www.afd-ld.org/~fdp_viro/content.php?page=interaction]
21. Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D: **The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer.** *Semin Cancer Biol* 2004, **14**:231-243.
22. Qian SW, Dumont N, O'Connor-McCourt MD, Burmester JK: **Distinct Functional Domains of TGF- β Bind Receptors on Endothelial Cells.** *Growth Factors* 1999, **17**:63-73.
23. Ingman WV, Robertson SA: **Defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction.** *BioEssays* 2002, **24**:904-914.
24. Zhu H-J, Burgess AW: **Regulation of Transforming Growth Factor- β Signaling.** *Molecular Cell Biology Research Communications* 2001, **4**:321-330.

25. Burch M, Zheng W, Little P: **Smad linker region phosphorylation in the regulation of extracellular matrix synthesis.** *Cellular and Molecular Life Sciences* 2011, **68**:97-107.
26. Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Taylor HS: **The Role of Growth Factors and Cytokines during Implantation: Endocrine and Paracrine Interactions.** *Semin Reprod Med* 2009, **27**:062,079.
27. Moulton B: **Transforming growth factor-beta stimulates endometrial stromal apoptosis in vitro.** *Endocrinology* 1994, **134**:1055.
28. Riley JK, Carayannopoulos MO, Wyman AH, Chi M, Moley KH: **Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity Is Critical for Glucose Metabolism and Embryo Survival in Murine Blastocysts.** *Journal of Biological Chemistry* 2006, **281**:6010-6019.
29. Gonzalez E, McGraw TE: **The Akt kinases: Isoform specificity in metabolism and cancer.** *Cell Cycle* 2009, **8**:2502-2508.
30. Vanhaesebroeck B, Alessi DR: **The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB.** *Biochemical Journal* 2000, **76**:561.
31. Dummmler B, Tschopp O, Hynx D, Yang Z-Z, Dirnhofer S, Hemmings BA: **Life with a Single Isoform of Akt: Mice Lacking Akt2 and Akt3 Are Viable but Display Impaired Glucose Homeostasis and Growth Deficiencies.** *Molecular and Cellular Biology* 2006, **26**:8042-8051.
32. Guzeloglu Kayisli O, Kayisli UA, Luleci G, Arici A: **In Vivo and In Vitro Regulation of Akt Activation in Human Endometrial Cells Is Estrogen Dependent.** *Biology of Reproduction* 2004, **71**:714-721.
33. Toyofuku A, Hara T, Taguchi T, Katsura Y, Ohama K, Kudo Y: **Cyclic and characteristic expression of phosphorylated Akt in human endometrium and decidual cells in vivo and in vitro.** *Human Reproduction* 2006, **21**:1122-1128.
34. Yoshino O, Osuga Y, Hirota Y, Koga K, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y: **Akt as a possible intracellular mediator for decidualization in human endometrial stromal cells.** *Molecular Human Reproduction* 2003, **9**:265-269.
35. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Aldo PB, Romero R, Mor G: **AKT Controls Human First Trimester Trophoblast Cell Sensitivity to FAS-Mediated Apoptosis by Regulating XIAP Expression.** *Biology of Reproduction* 2010, **82**:146-152.

36. Dan HC, Sun M, Kaneko S, Feldman RI, Nicosia SV, Wang H-G, Tsang BK, Cheng JQ: **Akt Phosphorylation and Stabilization of X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP).** *Journal of Biological Chemistry* 2004, **279**:5405-5412.
37. VOET D, VOET JG: *Biochimie*. 2iem edn: de Boeck; 2005.
38. Van Themsche C, Leblanc V, Parent S, Asselin E: **X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) Regulates PTEN Ubiquitination, Content, and Compartmentalization.** *Journal of Biological Chemistry* 2009, **284**:20462-20466.
39. Leblanc V, Dery MC, Shooner C, Asselin E: **Opposite regulation of XIAP and Smac/DIABLO in the rat endometrium in response to 17beta-estradiol at estrus.** *Reprod Biol Endocrinol* 2003, **1**:59.
40. Leslie NR, Downes CP: **PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling.** *Cellular Signalling* 2002, **14**:285-295.
41. Kayisli UA, Guzeloglu-Kayisli O, Arici A: **Endocrine-Immune Interactions in Human Endometrium.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004, **1034**:50-63.
42. McKay LI, Cidlowski JA: **Molecular Control of Immune/Inflammatory Responses: Interactions Between Nuclear Factor- κ B and Steroid Receptor-Signaling Pathways.** *Endocrine Reviews* 1999, **20**:435-459.
43. King AE, Critchley HOD, Kelly RW: **The NF- κ B pathway in human endometrium and first trimester decidua.** *Molecular Human Reproduction* 2001, **7**:175-183.
44. Chen WS, Xu P-Z, Gottlob K, Chen M-L, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, et al: **Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the akt1 gene.** *Genes & Development* 2001, **15**:2203-2208.
45. Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ: **Akt1/PKB α Is Required for Normal Growth but Dispensable for Maintenance of Glucose Homeostasis in Mice.** *Journal of Biological Chemistry* 2001, **276**:38349-38352.
46. Garofalo RS, Orena SJ, Rafidi K, Torchia AJ, Stock JL, Hildebrandt AL, Coskran T, Black SC, Brees DJ, Wicks JR, et al: **Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB β .** *The Journal of Clinical Investigation* 2003, **112**:197-208.

47. Tschopp O, Yang Z-Z, Brodbeck D, Dümmler BA, Hemmings-Mieszczak M, Watanabe T, Michaelis T, Frahm J, Hemmings BA: **Essential role of protein kinase By (PKBy/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis.** *Development* 2005, **132**:2943-2954.
48. Peng X-d, Xu P-Z, Chen M-L, Hahn-Windgassen A, Skeen J, Jacobs J, Sundararajan D, Chen WS, Crawford SE, Coleman KG, Hay N: **Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2.** *Genes & Development* 2003, **17**:1352-1365.
49. Yang Z-Z, Tschopp O, Di-Poi N, Bruder E, Baudry A, Dümmler B, Wahli W, Hemmings BA: **Dosage-Dependent Effects of Akt1/Protein Kinase B α (PKB α) and Akt3/PKBy on Thymus, Skin, and Cardiovascular and Nervous System Development in Mice.** *Molecular and Cellular Biology* 2005, **25**:10407-10418.
50. Dery MC, Leblanc V, Shooner C, Asselin E: **Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17 β -estradiol in the rat uterus during estrous cycle.** *Reproductive Biology and Endocrinology* 2003, **1**:47.
51. Asselin E, Mills GB, Tsang BK: **XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells.** *Cancer Res* 2001, **61**:1862.
52. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X: **Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition.** *Cell* 2000, **102**:33-42.
53. Reffey SB, Wurthner JU, Parks WT, Roberts AB, Duckett CS: **X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein Functions as a Cofactor in Transforming Growth Factor- β Signaling.** *Journal of Biological Chemistry* 2001, **276**:26542-26549.
54. Wang Y, Chang J, Li Y-C, Li Y-S, Shyy JY-J, Chien S: **Shear stress and VEGF activate IKK via the Flk-1/Cbl/Akt signaling pathway.** *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2004, **286**:H685-H692.
55. Béraud C, Henzel WJ, Baeuerle PA: **Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF- κ B activation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999, **96**:429.
56. St-Germain ME, Gagnon V, Parent S, Asselin E: **Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF- κ B/I κ B pathway.** *Molecular Cancer* 2004, **3**:7.

57. Gagnon V, St-Germain ME, Parent S, Asselin E: **Akt activity in endometrial cancer cells: regulation of cell survival through cIAP-1.** *International journal of oncology* 2003, **23**:803.
58. Kelly R, King A, Critchley H: **Cytokine control in human endometrium.** *Reproduction* 2001, **121**:3-19.
59. Wissink S, van Heerde EC, van der Burg B, van der Saag PT: **A Dual Mechanism Mediates Repression of NF- κ B Activity by Glucocorticoids.** *Molecular Endocrinology* 1998, **12**:355-363.
60. Maehama T, Dixon JE: **The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate.** *Journal of Biological Chemistry* 1998, **273**:13375.
61. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Eng C: **Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle.** *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000, **85**:2334.
62. del Re E, Babitt JL, Pirani A, Schneyer AL, Lin HY: **In the Absence of Type III Receptor, the Transforming Growth Factor (TGF)- β Type II-B Receptor Requires the Type I Receptor to Bind TGF- β 2.** *Journal of Biological Chemistry* 2004, **279**:22765-22772.
63. Alarcón C, Zaromytidou A-I, Xi Q, Gao S, Yu J, Fujisawa S, Barlas A, Miller AN, Manova-Todorova K, Macias MJ, et al: **Nuclear CDKs Drive Smad Transcriptional Activation and Turnover in BMP and TGF- β Pathways.** *Cell* 2009, **139**:757-769.
64. Remy I, Montmarquette A, Michnick SW: **PKB/Akt modulates TGF-[beta] signalling through a direct interaction with Smad3.** *Nat Cell Biol* 2004, **6**:358-365.
65. Liu Y, Shreder KR, Gai W, Corral S, Ferris DK, Rosenblum JS: **Wortmannin, a Widely Used Phosphoinositide 3-Kinase Inhibitor, also Potently Inhibits Mammalian Polo-like Kinase.** *Chemistry & Biology* 2005, **12**:99-107.